

A high-magnification microscopic image of red blood cells, showing their characteristic biconcave disc shape and reddish-orange color. The cells are densely packed, with some in sharp focus in the foreground and others blurred in the background.

# EVALUATION DER HÄMATOLOGIESYSTEME SYSMEX POCH-100IV DIFF UND XT-2000IV FÜR DIE TIERART HUND

CATHRIN DUNKER

**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere,  
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

**Evaluation der Hämatologiesysteme  
Sysmex pocH-100iV Diff und XT-2000iV  
für die Tierart Hund**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Cathrin Dunker**

Tierärztin aus Lübeck

Gießen, 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
Der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. Wehrendt

2. Gutachter: Prof. Dr. Lütteke

Tag der mündlichen Prüfung: 22. November 2010



# 1 INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>2</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>IV</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>4</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>2</b>
4.1	Impedanzmethode (Widerstandsmessung) .....	3
4.2	Quantitative Buffy-Coat (QBC)-Analyse .....	4
4.3	Optoelektronisches Messprinzip (Streulicht-/Lichtabsorptionsmessung) .....	5
4.4	Fluoreszenzmethode.....	7
4.5	Messprinzip des Sysmex XT-2000iV .....	7
4.5.1	Hämoglobinkanal.....	8
4.5.2	Erythrozyten- und Thrombozytenkanal .....	9
4.5.3	Leukozytenzählung und –differenzierung (Optisches System) .....	11
4.5.4	WBC/BASO-Kanal.....	13
4.5.5	4 DIFF-Kanal .....	14
4.5.6	Retikulozytenkanal (RET-Kanal) .....	15
4.5.7	Optische Thrombozyten (PLT-O) .....	15
4.6	Messprinzip des Sysmex poch-100iV Diff .....	18
4.6.1	Hämoglobinkanal.....	18
4.6.2	Erythrozyten- und Thrombozytenkanal .....	19
4.6.3	Leukozytenzählung und -differenzierung .....	20
4.7	Messprinzip des ADVIA2120 .....	22
4.7.1	Hämoglobinkanal.....	22
4.7.2	Erythrozyten- und Thrombozytenkanal .....	22
4.7.3	Retikulozytenzählung .....	23
4.7.4	Leukozytenzählung und –differenzierung.....	23
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
5.1	Patientengut.....	24
5.1.1	Alter.....	25
5.1.2	Geschlecht .....	25
5.1.3	Rasse .....	25
5.2	Methoden.....	25
5.2.1	Blutprobenentnahme .....	25
5.2.2	Antikoagulanzen.....	26
5.2.3	Blutprobenverarbeitung .....	26
5.2.4	Flag Roules .....	26

<b>5.3</b>	<b>Methodenvergleich</b>	<b>27</b>
5.3.1	Zentrifuge	27
5.3.2	Manuelle Differenzierung	28
5.3.3	Panoptische Färbung nach Pappenheim (PAN)	28
5.3.4	Retikulozytenfärbung (Supravitalfärbung)	28
5.3.5	Geräte	29
5.3.5.1	Sysmex pocH-100iV Diff	29
5.3.5.2	Sysmex XT-2000iV	32
5.3.5.3	ADVIA® 2120	34
<b>5.4</b>	<b>Versuchsprotokoll</b>	<b>35</b>
5.4.1	Präzision	35
5.4.1.1	Präzision innerhalb der Serie	35
5.4.2	Linearität und Carry over	36
5.4.3	Antikoagulanzenvergleich	37
5.4.4	Blutalterung und Lagerungstemperatur	37
<b>5.5</b>	<b>Statistik</b>	<b>37</b>
5.5.1	Korrelations- und Regressionsanalyse	37
5.5.2	Varianzanalyse	38
5.5.3	Signifikanz	39
5.5.4	ROC-Kurven-Analyse	39
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>6.1</b>	<b>Präzision</b>	<b>40</b>
6.1.1	Präzision innerhalb der Serie, pocH-100iV Diff und XT-2000iV	40
6.1.1.1	Blutzellzählung	41
6.1.1.2	Blutzelldifferenzierung	42
6.1.1.3	Retikulozytenzählung	44
<b>6.2</b>	<b>Methodenvergleich</b>	<b>44</b>
6.2.1	Richtigkeit der Blutzellzählung	45
6.2.2	Richtigkeit der Blutzelldifferenzierung	48
6.2.3	Richtigkeit der Retikulozytenzählung	53
<b>6.3</b>	<b>Linearität und Carry over</b>	<b>53</b>
6.3.1	Linearität	54
6.3.2	Carry over	55
<b>6.4</b>	<b>Antikoagulanzenvergleich</b>	<b>55</b>
<b>6.5</b>	<b>Blutalterung und Lagerungstemperatur</b>	<b>60</b>
6.5.1	Blutzellzählung	60
6.5.2	Blutzelldifferenzierung	67
6.5.3	Retikulozytenzählung	75
<b>7</b>	<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</b>	<b>77</b>
<b>7.1</b>	<b>Evaluierung von pocH-100iV Diff und XT-2000iV</b>	<b>77</b>
7.1.1	Präzision	77
7.1.1.1	Parameter der Blutzellzählung	78
7.1.1.2	Parameter der Blutzelldifferenzierung	79
7.1.1.3	Retikulozytenzählung	80
7.1.2	Methodenvergleich	82

7.1.2.1	Parameter der Blutzellzählung .....	82
7.1.2.2	Parameter der Blutzelldifferenzierung mit Fallbeispielen .....	87
7.1.2.3	Retikulozytenzählung .....	98
7.1.3	<i>Linearität und Carry over</i> .....	99
7.1.4	<i>Antikoagulanzenvergleich</i> .....	100
7.1.5	<i>Verlaufsuntersuchungen (Blutalterung und Lagerungstemperatur)</i> .....	104
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>114</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>117</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>122</b>

## 2 ABKÜRZUNGEN

Abb.	=	Abbildung
ANAE	=	a –Naphtylacetat- Esterase Färbung
BASO	=	Basophile Granulozyten
CHCM	=	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten ( <i>Cell Hemoglobin Concentration Mean</i> )
CN	=	Cyanid
CV	=	Variationskoeffizient ( <i>Coefficient of Variation</i> )
DIFF	=	Differentialblutbild
EOS	=	Eosinophile Granulozyten
fl	=	Femtoliter
fmol	=	Femtomol
HB/HGB	=	Hämoglobin ( <i>haemoglobin</i> )
HC	=	Haemoglobin Concentration
HDW	=	Hämoglobinverteilungsbreite ( <i>Haemoglobin Distribution Width</i> )
HCT/HKT	=	Gerätehämatokritwert
ICSH	=	Internationales Komitee für Standardisierung in der Hämatologie ( <i>International Committee for Standardization in Haematology</i> )
KCN	=	Kaliumcyanid
K <sub>3</sub> EDTA	=	Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure
Kap.	=	Kapitel
LYMPH	=	Lymphozyten
LUC	=	Large Unstained Cells
MCH	=	Mittlerer Zellulärer Hämoglobingehalt ( <i>Mean Corpuscular Haemoglobin</i> )
MCHC	=	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten ( <i>Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration</i> ), errechnet aus HCT und HB
MCV	=	Mittleres Erythrozytenvolumen ( <i>Mean Corpuscular Volume</i> )
MONO	=	Monozyten

MPV	=	Mittleres Thrombozytenvolumen ( <i>Mean Platelet Volume</i> )
n	=	Probenzahl
NCCLS	=	Nationales Komitee für Klinische Labor-Standard ( <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i> )
NEUT	=	Neutrophile Granulozyten
p	=	Signifikanz
PAN	=	Panoptische Färbung nach Pappenheim
PCV	=	Hämatokritwert ( <i>Packed Cell Volume</i> ), Mikrohämatokritzentrifuge
PDW	=	Thrombozyten Volumenverteilungsbreite ( <i>Platelet Volume Distribution Width</i> )
PLT	=	Thrombozytenzahl ( <i>Platelet Count</i> )
PMN	=	Polymorphnukleäre Zellen ( <i>Polymorphnucleated Cells</i> )
POX	=	Peroxidase Färbung
QBC	=	Quantitative Buffy-Coat Analyse
r /R	=	Korrelationskoeffizient
RBC	=	Erythrozytenzahl (( <i>Red Blood Cells</i> ) <i>Red Cell Count</i> )
RDW	=	Erythrozyten(volumen)verteilungsbreite ( <i>Red Cell (Volume) Distribution Width</i> )
RET/RET	=	Retikulozyten
S / SD	=	Standardabweichung
SLS	=	Sodiumlaurylsulfat
SLOPE	=	Steigung
Tab.	=	Tabelle
ml	=	Mikroliter
WBC	=	Leukozytenzahl
X	=	Mittelwert



### 3 EINLEITUNG

In den letzten 50 Jahren hat die Verfügbarkeit von automatischen Hämatologiesystemen zugenommen und gibt so den praktischen Tierärzten die Möglichkeit Blutproben routinemäßig für die klinische Diagnostik effizienter zu analysieren. Es wurden sowohl In-Haus-Geräte entwickelt, die aufgrund ihrer Kompaktheit und Anwenderfreundlichkeit dem Tierarzt in jeder Praxis vor Ort eine Zeitersparnis in der Blutanalyse ermöglichen, als auch Hämatologiesysteme, die in Laboratorien oder Kliniken zum Einsatz kommen. Diese mit unterschiedlichen der modernsten Messmethoden ausgestatteten Systeme weisen einen hohen Probendurchsatz auf und liefern detaillierte Informationen zur Beurteilung des Patientenstatus. Grundlage für veterinärmedizinisch genutzten Systeme bilden humanmedizinische Geräte, die in entsprechenden Studien angepasst und/oder in ihrer Einsatzfähigkeit an jeder für dieses System vorgesehenen Tierart überprüft werden müssen.

In der Klinik für Kleintiere, Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratriumsdiagnostik an der Justus-Liebig Universität in Gießen wurden in einer 1,5-jährigen Studie das In-Haus-Hämatologiesystem pochH-100iV Diff (Firma Sysmex) und der XT-2000iV (Firma Sysmex) für den Klinik- und Laboreinsatz hinsichtlich ihrer Einsatzfähigkeit bei der Tierart Hund überprüft. Die Evaluierung der Geräte erfolgte in Anlehnung an die veröffentlichten Richtlinien für die Evaluierung von Blutzellanalysegeräten (ENGLAND et al., 1994) und den Richtlinien der ICSH (International Committee for Standardization in Haematology, ICSH, 1994). Ergänzt wird die vorliegende Arbeit durch die gleichzeitige Evaluierung beider Hämatologiesysteme für die Tierart Katze von der Autorin Julia NAKAGAWA.

## 4 LITERATUR

Die veterinärmedizinischen Hämatologiesysteme wurden in den letzten 50 Jahren immer weiter entwickelt und damit verbessert. Mittlerweile sind vollautomatische Geräte in fast jeder Praxis vorhanden. Die unterschiedlichsten Messmethoden wurden entwickelt, um präzise Ergebnisse für Zellzahl und Differentialblutbild bei den verschiedenen Tierarten zu erhalten. Allen gemeinsam ist es, dass aus jeder Probe mehrere tausend Zellen analysiert werden, weshalb automatische Zellzählgeräte generell eine höhere Präzision und häufig auch Richtigkeit aufweisen als manuelle Techniken (ROLEFF, 2004).

Im folgenden Kapitel werden die wichtigsten automatischen Messmethoden der vielfach genutzten Analysegeräte dargestellt. Da schon viele Veröffentlichungen dieses Thema ausführlich beschreiben, verweise ich zudem auf die Autoren: MORITZ (2000), FICKENSCHER (2001) und ROLEFF (2004).



#### 4.1 Impedanzmethode (Widerstandsmessung)

Die Widerstandsmessung, Impedanzmessung oder auch Coulter-Prinzip genannt, ist die Methode, die am weitesten verbreitet ist. Mit ihr können Zellvolumen und Zellzahl von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten bestimmt werden. Weitere Parameter wie der Hämatokritwert oder die Erythrozytenindizes werden errechnet.

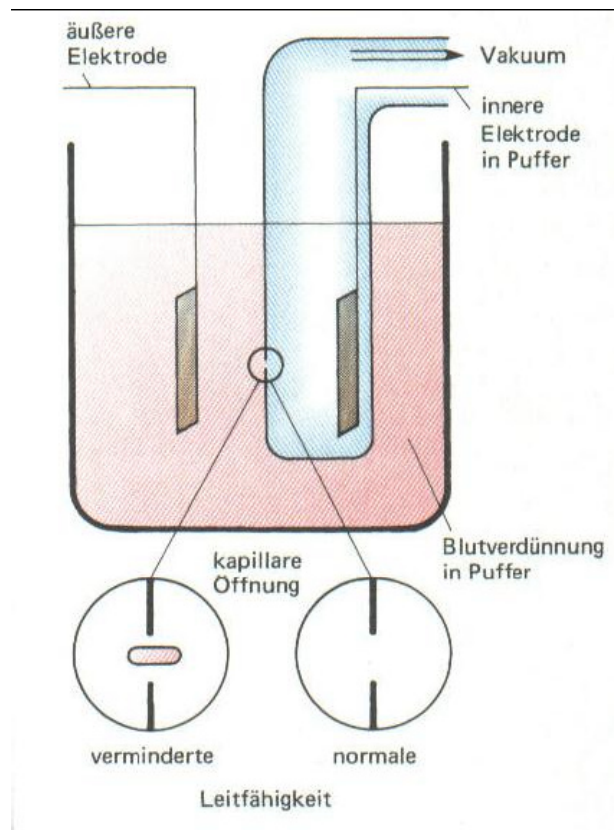


Abb. 1 Prinzip der Impedanzmessung modifiziert nach DÖRNER (1998)

Die zu analysierende Blutprobe wird mittels Elektrolytlösung verdünnt und durch eine kapillare Öffnung, die als Messöffnung dient, gesaugt. Zwischen zwei Elektroden, die beiderseits der Messöffnung liegen, fließt Gleichstrom (Abb.1). Blutzellen sind weniger leitfähig als die sie umgebende Elektrolytlösung, somit kommt es zur kurzfristigen Widerstandserhöhung beim Durchtritt der Blutzelle durch die Messöffnung. Damit die Änderung der Leitfähigkeit registriert werden kann, muss sie einen für jeden Zelltyp und jede Tierart festgesetzten Schwellenwert (Threshold, Diskriminator) überschreiten. Befinden sich die elektrischen Impulse im Messfenster

zwischen dem oberen und unteren Diskriminator, werden diese verstärkt und gezählt. Die Impulshöhe ist dabei proportional zum Zellvolumen und die Anzahl der Impulse proportional zur Zellzahl (ROLEFF, 2004).

Falsche Ergebnisse bei der Zellzählung bzw. Differenzierung der Blutzellen entstehen bei Geräten, die auf der Impedanzmethode beruhen, durch tierartliche Besonderheiten der Blutzellen. Große Thrombozyten der Katze können als Erythrozyten gezählt werden und somit zu einer falsch hohen Erythrozytenzahl führen. Da Parameter wie Hämatokritwert und Erythrozytenindizes berechnet werden, resultieren daraus weitere falsch hohe bzw. falsch niedrige Werte. Unterschiedliche Lyseresistenzen und Zellmorphologien der einzelnen Zellpopulationen, sowie kleine Erythrozyten (Pferd, Schaf, Ziege) sind ebenfalls Ursachen für falsche Ergebnisse (ROLEFF, 2004).

#### 4.2 Quantitative Buffy-Coat (QBC)-Analyse

Bei dieser Methode wird Vollblut mittels Zentrifugation aufgetrennt und die unterschiedliche Zelldichte und Fluoreszenzintensität (nach spezifischer Färbung) als Analysekriterium der einzelnen Zellpopulationen genutzt.

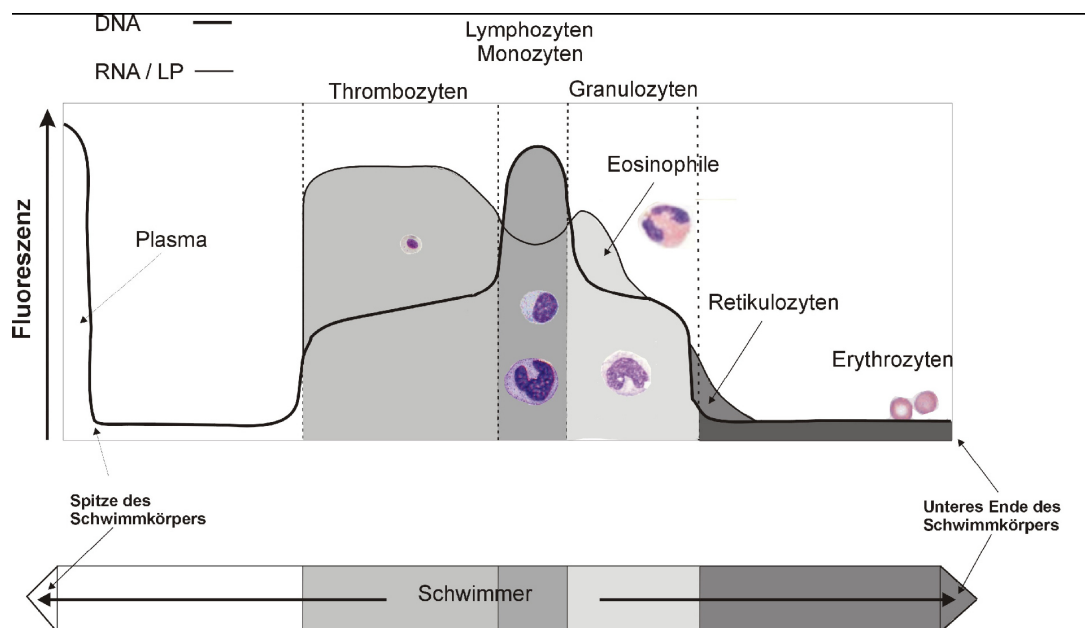


Abb. 2 Buffy - Coat - Profilkurve modifiziert nach MORITZ (2002)

Der Fluoreszenzfarbstoff (Acridinorange) zur Anfärbung der Zellen befindet sich an der Kapillarwand. Das zu analysierende EDTA-Blut wird nun in die Kapillare aufgesaugt, in der sich ein Schwimmerkörper befindet. Bei der folgenden Zentrifugation (12000 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten) werden die Zellen zwischen Schwimmer und Kapillarwand gedrängt, was zu einer Streckung des Buffy Coats führt. Zur besseren Abgrenzung der Granulozyten werden die Erythrozyten mittels Kaliumoxalat geschrumpft. Das Kaliumoxalat befindet sich ebenfalls in der Kapillare und bewirkt eine Erhöhung der Osmolarität des Plasmawassers, infolgedessen die Erythrozyten schrumpfen. Dies geht mit einer Erhöhung der Dichte der Erythrozyten einher, welche sich somit besser von den Granulozyten abgrenzen lassen. Das Acridinorange bindet an die Nukleinsäuren (DNA, RNA) und Glykosaminoglykane bzw. Lipoproteine der Leukozyten und Thrombozyten. Durch die unterschiedliche Fluoreszenzintensität der Zellpopulationen lassen sich die einzelnen Buffy Coat Schichten ablesen. Der Schwimmer hat in etwa das Gleiche spezifische Gewicht wie die Buffy Coat Zellen, seine Eintauchtiefe in die dichtgepackten Erythrozyten wird ermittelt und zur Berechnung der Hämoglobinkonzentration genutzt (siehe Abb 2, ROLEFF, 2004).

#### **4.3 Optoelektronisches Messprinzip (Streulicht-/Lichtabsorptionsmessung)**

Man unterscheidet bei dieser Methode die Streulichtmessung und die Absorbimetrie. Ein schmal gebündelter Lichtstrahl (Laserlicht) trifft auf eine Zelle und das Licht wird in unterschiedliche Richtungen gestreut bzw. geschwächt. Streuung bzw. Abschwächung des Lichtstrahls werden bewertet.

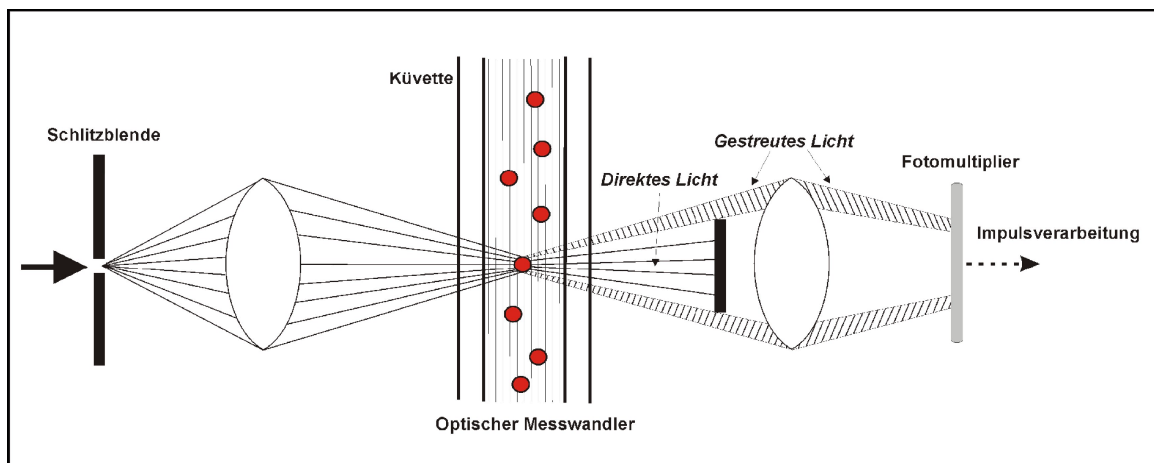


Abb. 3: Optoelektrisches Messprinzip nach THOM (1979)

Befindet sich keine Zelle im Lichtstrahl, kommt es zu keiner Streuung und das auf die Zählküvette fokussierte Licht wird hinter der Küvette durch eine schwarze Scheibe ausgeblendet. Wird der Lichtstrahl jedoch durch die Anwesenheit einer Zelle gestreut, wird der Strahl auf einen Photomultiplier geleitet, der den Lichtimpuls in einen elektrischen Impuls umwandelt und verstärkt (siehe Abb. 3, ROLEFF, 2004).

In der modernen Laser-Durchflusszytometrie wird die Zellsuspension von partikelfreier Lösung ummantelt und als dünn ausgezogener, hydrodynamisch fokussierter Flüssigkeitsstrom durch die Küvette geleitet (THOM, 1979). Es wird erreicht, dass jede Zelle einzeln, hintereinander den Laserstrahl passiert und Streulicht verursacht (ROLEFF, 2004). Es ergeben sich unterschiedliche Streulichtwinkel, man unterscheidet Kleinwinkelstreulicht und Großwinkelstreulicht. Kleinwinkelstreulicht ( $1-6^\circ$ ) liefert Informationen über die Zellgröße. Als Großwinkelstreulicht bezeichnet man Streulicht von mehr als  $8^\circ$  und liefert Informationen über die intrazelluläre Beschaffenheit der Zelle, insbesondere über die Granularität (MORITZ, 2000). Die beschriebene Methode eignet sich zur Zählung von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten, sowie zur Differenzierung von Leukozyten. Ergänzt werden die Ergebnisse von Histogrammen.

Die asymmetrisch bikonkave Form der Erythrozyten stellt für optische Systeme ein Problem dar, da je nachdem wie sich die Zelle im Lichtstrahl ausrichtet (seitlich oder planar) die Impulse unterschiedlich hoch ausfallen (THOM, 1990). Um solche orientierungsbedingten Effekte auszuschließen, findet vor der Erythrozytenzählung eine isovolumetrische Aufkuglung der Zellen statt (z.B. beim ADVIA 120, MORITZ, 2000).

#### **4.4 Fluoreszenzmethode**

Durch die Kombination von Streulicht- und Fluoreszenzmessung können z.B. Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Retikulozyten identifiziert werden (WEBER, 1992). Die in den Zellen vorhandene Nukleinsäure (RNA bzw. DNA) wird mit sich quantitativ anlagernden fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Spezifische Oberflächen- und intrazelluläre Marker dienen zur Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen. Die simultane Erfassung von Streu- und Fluoreszenzlichtintensität ermöglicht eine Trennung von Erythrozyten (ungefärbt) und fluoreszierenden Retikulozyten (DURA, 2005).

#### **4.5 Messprinzip des Sysmex XT-2000iV**

Der Sysmex XT-2000iV gehört zu den vollautomatischen Hämatologiesystemen und nutzt unterschiedliche, zum Teil kombinierte der oben genannten Messverfahren zur Zellzählung und Differenzierung von EDTA- antikoaguliertem Vollblut. Das Blut wird über eine Vollblutpumpe angesaugt und gelangt in einer bestimmten Reihenfolge (RBC/PLT/HCT -> HGB -> RET -> WBC/BASO -> DIFF) durch das Probendosierventil und dann in die einzelnen Messkanäle. In diesem Abschnitt sollen die unterschiedlichen Messkanäle des Sysmex XT2000iV dargestellt werden. Zur weiteren Beschreibung des Gerätes siehe auch Kapitel 3.3.5.2 Geräte.

### 4.5.1 Hämoglobinkanal

Die ursprüngliche Hämoglobin-Bestimmung nach DIN 58931 sieht vor, dass die Erythrozyten zunächst in einer Verdünnung von 1: 500 lysiert werden. Im Anschluss laufen folgende Reaktionsstufen ab.

1. Reaktionsstufe: Hämoglobin (HGB) mit eingebundenem  $\text{Fe}^{2+}$  wird durch Kaliumhexacyanoferrat (rotes Blutlaugensalz) zu Methämoglobin (mit  $\text{Fe}^{3+}$ ) oxidiert.
2. Reaktionsstufe: Methämoglobin reagiert mit Kaliumcyanid (KCN) unter Bildung des roten, stabilen Cyanhämoglobin-Komplexes, der ein Absorptionsmaximum bei 546nm besitzt.

Die Extinktion im Absorptionsmaximum ist dem Hämoglobingehalt des Nativblutes direkt proportional. Nachteil: Das Einleiten von cyanidhaltigen Abfällen ist genehmigungspflichtig.

Als Alternative zu KCN entwickelte Sysmex die cyanidfreie Sodiumlaurylsulfat-(SLS)-Methode. Das SLS ist ungiftig und in vielen Seifen enthalten. Sysmex verwendet es als Standard an allen Sysmex-Geräten. Im ersten Schritt wird das Globin denaturiert. Die hydrophoben Gruppen des SLS binden an das Globin und bewirken eine Konformitätsänderung. Im zweiten Schritt wird das  $\text{Fe}^{2+}$  des Häms zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert. Nun können die hydrophilen Gruppen des SLS an das  $\text{Fe}^{3+}$  binden und bilden mit diesem ein stabiles Reaktionsprodukt, das photometrisch (bei 555nm) bestimmt werden kann (siehe Abb.: 4 Hämoglobin Flussplan, SYSMEX Schulungsunterlagen 2000).

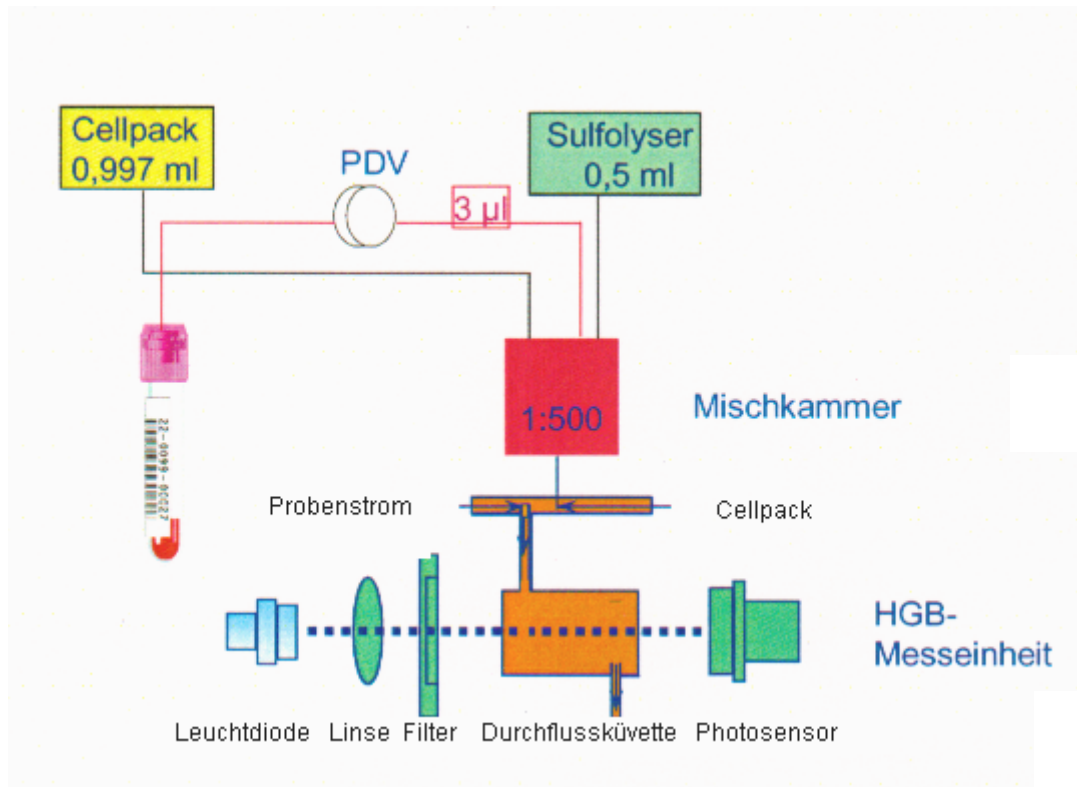


Abb.: 4 Hämoglobin Flussplan (SYSMEX Schulungsunterlagen, 2000)

#### 4.5.2 Erythrozyten- und Thrombozytenkanal

Der Sysmex XT-2000iV verwendet zur Bestimmung von Erythrozyten, Thrombozyten und Hämatokrit die bereits beschriebene Impedanzmethode (siehe auch 4.5.7. PLT-O). Erythrozyten und Thrombozyten werden verdünnt (1:500) und in einem gemeinsamen Messvorgang gezählt, da die beiden Zellreihen sich auf Grund ihrer unterschiedlichen Größenbereiche gut trennen lassen. Nach der Vorbehandlung gelangt der Probenstrom mittels Injektionspumpe in die Messkammer. Unterstützt wird diese Messung durch die hydrodynamische Fokussierung, dabei dient das Reagenz Cellpack als Mantelstrom. Unterschiedlich schnelle Fließgeschwindigkeiten von Proben- und Mantelstrom erzeugen eine laminare Strömung, somit wird im Messkanal der Flusszelle eine Zellvereinzelung erreicht (siehe Abb. 5). Die Erythrozyten der Tierart Hund haben einen Volumenbereich von 80-100fl, alle Teilchen die Impulse zwischen 25 und 250fl liefern, werden erfasst. Die Volumenverteilungskurven werden durch variable Schwellenwerte (Diskriminatoren) eingegrenzt. Der Messbereich für die Thrombozyten liegt zwischen 2 und 30 fl. Das

Gerät besitzt einen unteren Diskriminator (PL) bei 2 bis 6 fl und einen oberen Diskriminator (PU) bei 12 bis 30 fl. Die Diskriminatoren können innerhalb dieser vorgegebenen Grenzen flotieren und suchen sich automatisch das Tal zwischen den Zellpopulationen. Darüberhinaus gibt es einen fixen Diskriminator bei 12 fl, der zur Bestimmung des Anteils großer Thrombozyten an der Gesamtthrombozytenzahl (P-LCR – Platelet Large Cell Ratio) herangezogen wird.

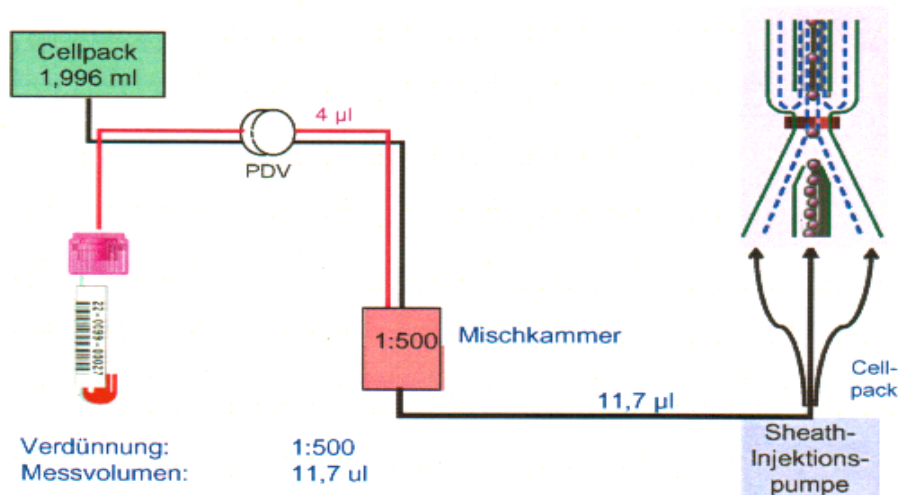


Abb.: 5 RBC/PLT/HKT Flussplan mit hydrodynamische Fokussierung (SYSMEX, Schulungsunterlagen, 2000)

Als graphische Kontrolle der Ergebnisse dienen dem Anwender die Histogramme (siehe Abb.: 6). Das Gerät überprüft den Kurvenverlauf (Impedanzkurve) bei jeder Messung und gibt bei Abweichungen entsprechende Warnmeldungen - sogenannte Flags – an, die dem Anwender Hinweise auf Störfaktoren (z.B. Mikroerythrozyten, Fragmentozyten oder Riesenthrombozyten) geben können.

Treten diese abnormalen Impedanzkurven auf, nutzt das Gerät neben der Volumentrennung eine weitere Technik zur genauen Trennung der Erythrozyten von den Thrombozyten, die Bestimmung der Fluoreszenzintensität. Siehe hierzu Kapitel 2.5.3 Fluoreszenz.

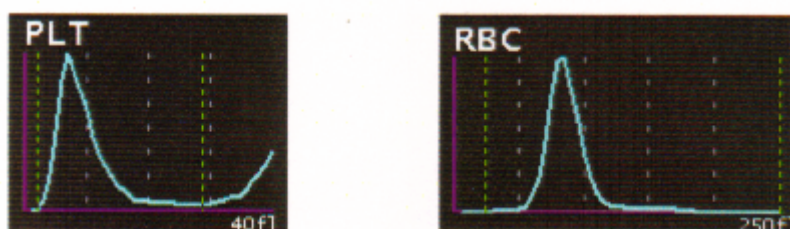


Abb.: 6 Histogramme RBC und Thrombozyten (PLT), (SYSMEX, 2000)



Der Hämatokrit wird auf der Grundlage der kumulativen Impulshöhensummierung ermittelt. Hier werden die Volumina der innerhalb der Schwellenwerte liegenden gezählten Erythrozyten addiert und zum Volumen der Messverdünnung ins Verhältnis gesetzt.

Die Erythrozytenindizes MCV (Mittleres Zellvolumen), MCH (Mittlerer Zellulärer Hämoglobingehalt) und MCHC (Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten) errechnet das Gerät aus den Werten von Hämoglobin, Erythrozytenzahl und Hämatokrit. Die Thrombozytenindizes MPV und PDW werden ebenfalls vom Gerät mittels Partikelverteilungsanalyse ermittelt.

#### ***4.5.3 Leukozytenzählung und –differenzierung (Optisches System)***

Durch die bisher beschriebenen Techniken erhält das Gerät Informationen über Volumen und Granularität der Blutzellen. Der Sysmex XT-2000iV nutzt zusätzlich die Fluoreszenzmessung, um die einzelnen Zellpopulationen anhand ihrer Zellaktivität (DNA- und RNA- Anteil) besser differenzieren zu können. Das Gerät verfügt über zwei Kanäle, den WBC/BASO-Kanal zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl sowie zur Differenzierung der basophilen Granulozyten und den 4 DIFF-Kanal, zur Abgrenzung von Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen Granulozyten und neutrophile + basophilen Granulozyten. Im 4 DIFF-Kanal wird die Fluoreszenzintensität bestimmt, sie ist ein Maß für die Zellaktivität. Je höher die Intensität des Fluoreszenzlichtes, desto höher ist die Zellaktivität (z.B.: aktivierte Lymphozyten oder Lymphoblasten).

Das Optische System (siehe Abb.: 7) ist eine Kombination der einzelnen Messtechniken, welches die zum Teil hervorgehobenen Eigenschaften der Zellen nach der Vorbehandlung erfasst und die einzelnen Populationen voneinander trennt:

- Zellvolumen mit der Impedanzmethode (nur RBC und PLT)
- Laser-Durchflusszytometrie zur Bestimmung von
  - Zellgröße (Vorwärtsstreulicht) und
  - interner Struktur, z.B. Granulation oder Vakuolen (Seitwärtsstreulicht)
- Fluoreszenzintensität zur Bestimmung des Nukleinsäureanteils (DNA und RNA)

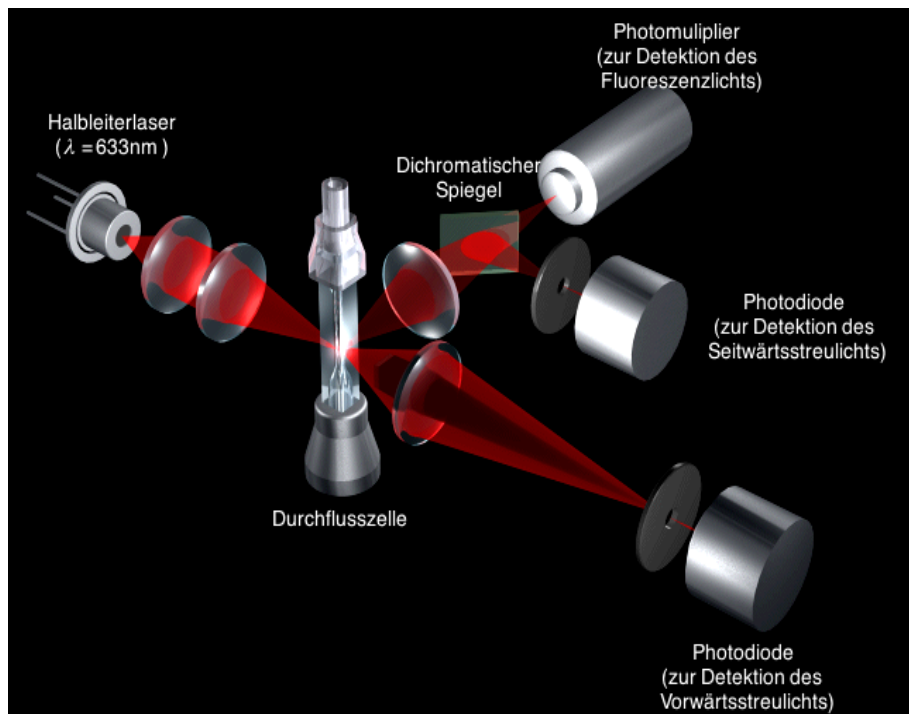


Abb. 7: Messtechnik Optisches System, (Sysmex 2000)

#### 4.5.4 WBC/BASO-Kanal

Der WBC/BASO-Kanal dient zur Zählung der Leukozyten und Bestimmung der Basophilen. Hierzu werden 20 µl der zu messenden Blutprobe mit 0,98 ml Stromatolyser-FB auf ein Verhältnis von 1:50 verdünnt und in die Reaktionskammer verbracht. Nach einer Reaktionszeit von etwa 14 Sekunden hat das Reagenz Stromatolyser-FB die in der verdünnten Probe befindlichen Erythrozyten und Thrombozyten lysiert und alle „nicht-basophilen“ Zellen bis auf den Kern geschrumpft. Der Probenstrom gelangt nun mittels Injektionspumpe in das optische System, hier wird die Gesamtleukozytenzahl bestimmt und die basophilen Zellen aufgrund ihrer Größe differenziert. Das Ergebnis wird graphisch in einem Scattergramm angezeigt. Auf der x-Achse werden mittels Seitwärtsstreulicht Informationen über Granularität und innere Struktur angegeben und an der y-Achse kann das Volumen der Zellen anhand des Vorwärtsstreulichtes abgelesen werden (siehe Abb.8).

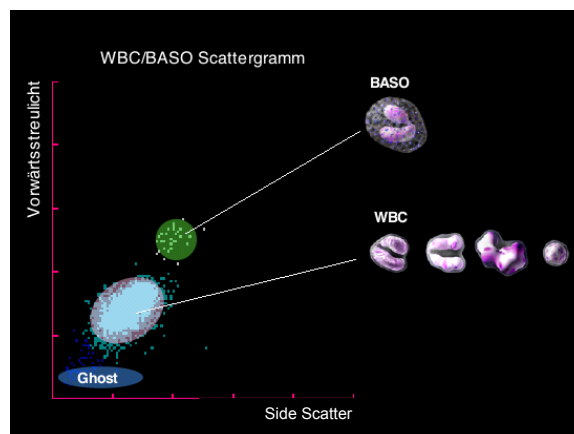


Abb.: 8 WBC/BASO-Kanal, normale Zellverteilung, (Sysmex, 2000)

#### 4.5.5 4 DIFF-Kanal

Im 4 DIFF-Kanal erfolgt die Differenzierung der Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile, Neutrophile und Basophile. Das zu analysierende Volumen wird mit den Reagenzien Stromatolyser-4DL (0,98ml) und Stromatolyser-4DS (40µl) versetzt. Der erst genannte Stromatolyser enthält ein nichtionisches Tensid und dient einerseits der Verdünnung der Probe, andererseits zur Lyse von Erythrozyten und Thrombozyten. Darüber hinaus wird die Membran der Leukozyten perforiert. Durch die durchlässigen Membranen der Leukozyten kann das einen Polymethin-Fluoreszenzfarbstoff enthaltende Färbereagenz Stromatolyser-4DS in das Zellinnere diffundieren und die Nukleinsäuren (DNA und RNA) anfärben. Nach einer Reaktionszeit von 22 Sekunden im DIFF-Kanal gelangt der Probenstrom mittels Injektionspumpe in das optische System. Unterstützt wird das Ergebnis graphisch durch ein Scattergramm: Die x-Achse gibt mittels Seitwärtsstreulicht Informationen über Granularität und innere Struktur der Zellen, die y-Achse gibt durch die Fluoreszenzintensität der Zellen Informationen über die Zellaktivität (siehe Abb.: 9).

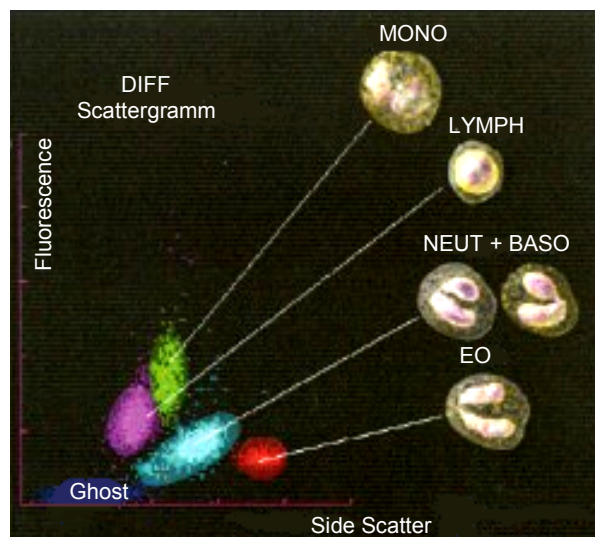


Abb.: 9 4 DIFF-Kanal, normale Zellverteilung, (Sysmex, 2000)

#### **4.5.6 Retikulozytenkanal (RET-Kanal)**

1881 beschrieb Prof. Paul Ehrlich erstmals die Retikulozyten, die ihren Namen der intrazellulären Netzstruktur verdanken. Die Netzstruktur kann mit Supravitalfärbung dargestellt werden, welche der Sysmex XT-2000iV im RET-Kanal nutzt. Das Gerät bestimmt die Retikulozyten mit der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. Das zu bestimmende Blutvolumen wird mit RET Search II Diluent (0,996 ml) und RET Search II DYE (20µl) versetzt und verbleibt 31 Sekunden in der Reaktionskammer. Der erste Zusatz perforiert die Zellmembranen von Erythrozyten, Thrombozyten, Retikulozyten und allen Leukozyten. Im Anschluss kann der Fluoreszenzfarbstoff (RET Search II Dye) in das Zellinnere eindringen und die RNA- und DNA-Bestandteile der Zellen anfärben. Nach der Reaktionszeit gelangt der Probenstrom mittels Injektionspumpe in das optische System. Hier erfolgt die Zählung und „Differenzierung“ der Retikulozyten durch Vorwärtsstreulicht (Volumen) und Intensität des Fluoreszenzlichtes (Zellaktivität). Eine „Differenzierung“ der Retikulozyten ist anhand der Intensität der Färbung möglich: je unreifer ein Retikulozyt, desto stärker ist die Fluoreszenzfärbung. Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse erhält der Anwender graphisch durch ein Scattergramm, die x-Achse zeigt die Zellaktivität (Fluoreszenzintensität) und die y-Achse das Zellvolumen (Vorwärtsstreulicht). Die Leukozyten und eventuell vorhandene Normoblasten zeigen die höchste Zellaktivität, Erythrozyten dagegen die geringste, somit sind sie von den Retikulozyten abgrenzbar.

#### **4.5.7 Optische Thrombozyten (PLT-O)**

Im RET-Kanal bietet der Sysmex XT-2000iV eine zusätzliche Möglichkeit der Thrombozytenbestimmung. Die Blutprobe wird im RET-Kanal wie im Kapitel 4.5.6 beschrieben vorbehandelt und der Nukleinsäureanteil (DNA und RNA) der Thrombozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Das Gerät bietet die

Möglichkeit, bei abnormaler Impedanzkurve der Thrombozyten (PLT-I) aus dem Erythrozyten- Thrombozytenkanal auf den Fluoreszenzthrombozytenwert (PLT-O) aus dem RET-Kanal umzuschalten. Abnormale Werte bei der Impedanzmessung können zum Beispiel durch das Vorkommen von Mikroerythrozyten, Fragmentozyten oder Riesenthrombozyten auftreten. Das Erfassen der Zellaktivität mittels Fluoreszenz ermöglicht so eine bessere Abgrenzung der Thrombozyten von der Erythrozytenpopulation. Der PLT-I Wert wird nur als Ergebnis übernommen, wenn keine Interferenzen in der Impedanzmessung detektiert wurden. Bei erfolgter Umschaltung auf PLT-O wird dies dem Anwender durch einen entsprechenden Hinweis in Form des „&“ Symbols hinter dem PLT-Wert angezeigt. Zur Kontrolle der Ergebnisse dienen dem Anwender die Histogramme für Erythrozyten und Thrombozyten (PLT-I) und das Scattergramm des RET-Kanals, in dem auch die Thrombozyten (PLT-O) graphisch dargestellt sind.

Durch die Bestimmung der Thrombozyten und Retikulozyten hat der Anwender die Möglichkeit auch retikulierte („jugendliche“) Thrombozyten bei der Routineblutanalyse zu bestimmen und erhält damit Informationen über die Erythro- und Megakaryopoese (Pankraz et al. 2007, Automated detection of immature platelets).

Ein Datenreport eines Hundes mit zugehörigen Histo- und Scattergrammen ist in Abbildung 10 dargestellt.

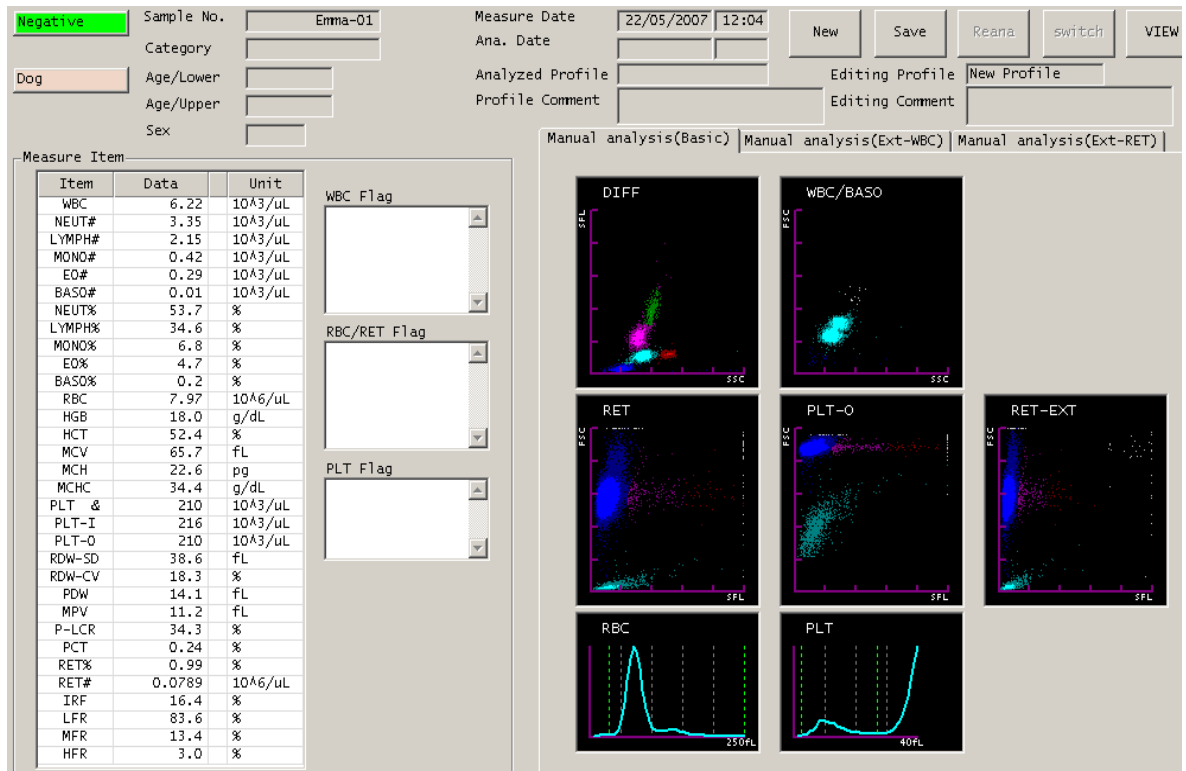


Abb.: 10 Vollständiger Datenreport eines gesunden Hundes des XT-2000iV

#### **4.6 Messprinzip des Sysmex pochH-100iV Diff**

Bei dem Sysmex pochH-100iV Diff (poch = point of care Hematology) handelt es sich um ein vollautomatisches Hämatologiesystem, dass für den alltäglichen Praxisbedarf entwickelt wurde. In diesem Abschnitt wird auf die Messmethoden des Gerätes eingegangen, weitere Spezifikationen siehe auch Kapitel 3.3.5.1 Geräte.

##### **4.6.1 Hämoglobinkanal**

Das Gerät arbeitet mit einer zyanidfreien Methode zur Bestimmung des Hämoglobins (HGB). Das Reagenz pochH-pack LVD beinhaltet quaternäre Ammoniumsalze, welche zur Hämoglobin- und Leukozytenanalyse verwendet werden. Es laufen nacheinander folgende Reaktionen ab.

1. Lyse der Erythrozyten und Thrombozyten durch quaternäre Ammoniumsalze (pochH-pack LVD)
2. Konformationsänderung des Hämoglobinmoleküls
3.  $\text{Fe}^{2+}$  des Häms wird oxidiert zu  $\text{Fe}^{3+}$

Es bildet sich ein stabiler Methämoglobinkomplex, dieser ist direkt proportional zum Hämoglobin und wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 555nm bestimmt.



#### 4.6.2 Erythrozyten- und Thrombozytenkanal

Erythrozyten und Thrombozyten werden gemeinsam mittels der Impedanzmethode (Widerstandsmessung) in einem Kanal bestimmt. Unterstützt wird die Analyse auch hier durch die hydrodynamische Fokussierung (siehe auch Kapitel 2.5.2). Das Reagenz pochH-pack D dient als Mantelstrom, dadurch wird eine laminare Strömung erzeugt und eine Zellvereinzelung erreicht. Damit die Widerstandsänderung beim Durchtritt der Zelle durch die Messöffnung registriert werden kann, muss sie einen bestimmten für jede Tierart festgelegten Schwellenwert (Diskriminator) überschreiten. Für die vordefinierte Tierart Hund gibt es zwei flotierende Diskriminatoren (lower/upper discriminator, LD und UD), d.h. sie bewegen sich jeweils frei innerhalb eines vorgegebenen Bereiches und suchen dort das optimale Tal. Der Volumenbereich, in dem Erythrozyten registriert werden liegt zwischen 10 und 250 fl, die Thrombozyten werden zwischen 1 und 25 fl registriert. Die Ergebnisse für Erythrozyten- und Thrombozytenzahl werden numerisch und auch graphisch in Form eines Histogramms ausgegeben, mit Hilfe dessen das Ergebnis kontrolliert und gegebenenfalls manuell korrigiert werden kann (siehe Abb.12).

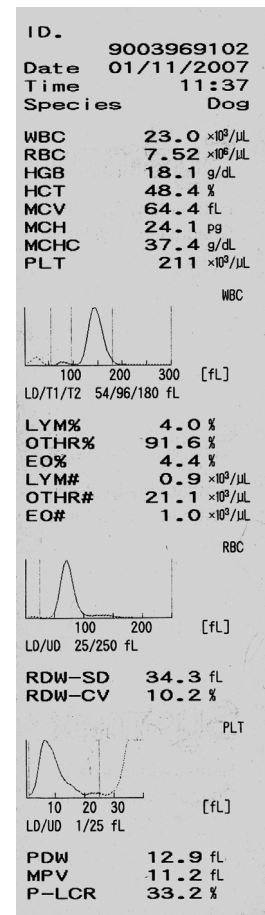
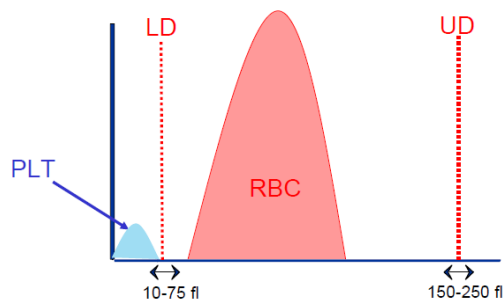


Abb. 11: Ergebnisreport des pochH-100iV Diff, Tierart: Hund

Abb. 12: schematische Darstellung der Diskriminatoren des RBC Histogramms für den poch-100iV Diff (Sysmex, PM Veterinary Applications)



Die dargestellte Histogramm-Kurve in Abbildung 12 sollte innerhalb der beiden Diskriminatoren LD und UD an der Basislinie beginnen und enden.

Der Hämatokrit wird auf der Grundlage der kumulativen Impulshöhensummierung ermittelt. Hier werden die Volumina der innerhalb der Diskriminatoren liegenden gezählten Erythrozyten addiert und zum Volumen der Messverdünnung ins Verhältnis gesetzt.

Die Erythrozytenindizes MCV (Mittleres Zellvolumen), MCH (Mittlerer Zellulärer Hämoglobingehalt) und MCHC (Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten) errechnet das Gerät aus den Werten von Hämoglobin, Erythrozytenzahl und Hämatokrit. Die Thrombozytenindizes MPV und PDW werden vom Gerät mittels Partikelverteilungsanalyse ermittelt. Abbildung 11 zeigt den Ergebnisreport des poch-100iV Diff für die Tierart Hund.

#### **4.6.3 Leukozytenzählung und -differenzierung**

Die bei der Leukozytenzählung störenden Erythrozyten werden durch den Zusatz von poch-pack LVD lysiert, dabei wird Hämoglobin freigesetzt. Das Lysereagens löst nicht nur die Erythrozyten auf, sondern zerstört die Zellmembran der Leukozyten, so dass diese Zellen „schrumpfen“. Bei der folgenden Leukozytenzählung auf

Grundlage der Impedanzmethode erzeugen daher nur die Zellkerne und die umgebenden Zellorganellen eine Widerstandserhöhung. Zusätzlich zur Leukozytenzahl kann aufgrund der unterschiedlichen Zellkerngröße eine Differenzierung in kleine (Lymphozyten), mittelgroße (Monozyten, Neutrophile und evt. vorhandene Basophile Granulozyten) und große (Eosinophile Granulozyten) Zellen vorgenommen werden. Zur Unterteilung der einzelnen Populationen gibt es bei der Spezies Hund zwei weitere, innerhalb festgesetzter Grenzen flotierende Diskriminatoren, T1 und T2, sogenannte „Tal-Diskriminatoren“. Als Ergebnis entsteht ein 3-Zell-Differentialblutbild bestehend aus Lymphozyten, Eosinophilen Granulozyten und OTHER, einer Population, in der die Monozyten, Neutrophilen Granulozyten und eventuell vorhandene Basophile Granulozyten zusammengefasst werden (Abkürzung: OTHR). Zur Kontrolle der Zelldifferenzierung und möglicher manueller Korrektur der Schwellenwertpositionen dient das zusätzlich ausgegebene Histogramm (siehe Abb. 13).

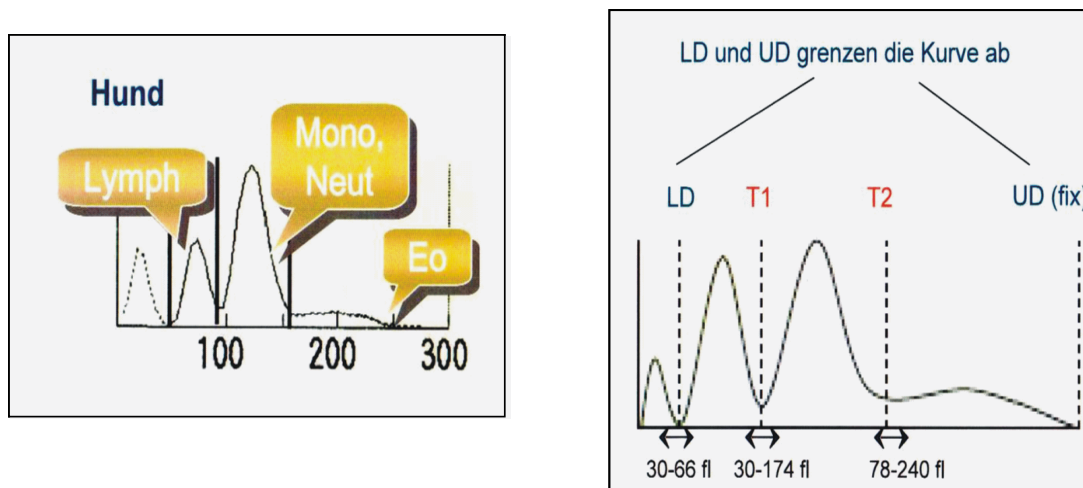


Abb. 13: WBC Histogramm Hund, 3-part Differenzierung (links), Darstellung der Diskriminatoren für WBC Histogramm des pochH-100iV Diff (rechts)  
(Sysmex, PM Veterinary Applications)

Bei der Leukozytenmessung sind Thrombozyten vorhanden (Erythrozyten werden lysiert). Da das Volumen der Thrombozyten normalerweise 5 – 18 fl beträgt, trennt der LD (lower discriminator) die Leuko- von den Thrombozyten. Die Histogrammkurve sollte zwischen den Diskriminatoren LD und UD liegen sowie an der Basislinie beginnen und enden.

#### **4.7 Messprinzip des ADVIA 2120**

Ein Referenzgerät im Rahmen dieser Untersuchungen stellt der ADVIA 2120 der Firma Siemens dar (siehe auch Kapitel 3.3.5.3 Geräte). Es handelt sich als vollautomatisches Blutanalyzesystem um die zweite Generation des ADVIA 120. Die Messtechnologie des hier verwendeten Gerätes zur Zellzahlbestimmung und – differenzierung bei den einzelnen Tierarten hat sich gegenüber dem ADVIA 120 nicht verändert. Neu gegenüber dem ADVIA 120 ist ein standardisiertes Cyanid-freies Reagenz bei der Hämoglobinbestimmung, eine Methode zur Normoblastenbestimmung ist noch in Vorbereitung und ein modernes Design mit Flachbildschirm wurde entwickelt. Das System erstellt kleine als auch große Blutbilder und bestimmt die Retikulozytenzahl. In diesem Abschnitt soll nur kurz auf die wichtigsten Messtechnologien eingegangen werden. Da bereits viele Veröffentlichungen mit ausführlichen Beschreibungen dieser Technologie existieren wird auf die Arbeiten von MORITZ, 2000; FICKENSCHER, 2001; DURA, 2005 oder MEYER, 2005 verweisen.

##### **4.7.1 Hämoglobinkanal**

Die zu analysierende Probe und ADVIA 2120 CN-freies HGB Reagenz werden in der Hämoglobinreaktionskammer, dem Kolorimeter, gemischt. Das zugesetzte Reagenz lysiert die Erythrozyten und nach Ablauf der chemischen Reaktionen kann das freigesetzte Hämoglobin photometrisch bei 546 nm bestimmt werden.

##### **4.7.2 Erythrozyten- und Thrombozytenkanal**

In diesem Kanal werden die Zellen des roten Blutbildes bestimmt. Nach isovolumetrischer Aufkuglung oder sog. „Sphering“ der Erythrozyten bzw. Thrombozyten erfolgt eine Zweiwinkelstreulichtmessung im Laserstrahl (optoelektronisches Messprinzip) und so eine direkte Messung des individuellen Zellvolumens und der intrazellulären Hämoglobinkonzentration. Der Winkelbereich

des Kleinwinkelstreulichtsignals liegt hier bei 2-3°, der des Großwinkelstreulichts bei 5-15°. Zellvolumen und die intrazelluläre Beschaffenheit werden graphisch und numerisch auf dem Bildschirm dargestellt. Berechnet werden aus dem gemessenen Erythrozytenvolumen und der mittleren Hämoglobinkonzentration der Hämatokritwert, das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV), die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW), die Hämoglobinverteilungsbreite (HDW) und die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC).

Eine 2-dimensionale Thrombozytenanalyse (2D-THROMBO-Methode) basiert auf der integrierten Analyse der Messungen von Erythrozyten und Thrombozyten. Ein Thrombo-Streulicht-zytogramm wird gebildet, indem das Kleinwinkel-Streulicht (verstärkt) und Großwinkel-Streulicht (verstärkt) kombiniert und in Volumen- und Brechungsindexwerte umgerechnet werden. So wird eine genauere Abtrennung von Zell- und Erythrozytenfragmenten, großen Thrombozyten (aktivierte Thrombozyten > 20fl) und Mikro-/Fragmentozyten von wahren Thrombozyten ermöglicht (DURA, 2005).

#### **4.7.3 Retikulozytenzählung**

Zur Bestimmung der Retikulozyten werden diese entsprechend ihres RNA-Gehaltes durch einen Abkömmling des Neu-Methylenblau, das Oxazin 750 haltige ADVIA 2120 autoRETI Reagenz, angefärbt. Durch Zweiwinkelstreulichtmessung erfolgt die Größenbestimmung der Zellen und anhand der Absorption die Klassifizierung nach RNA-Gehalt in verschiedene Retikulozytenreifegrade oder Erythrozyten (DURA, 2005).

#### **4.7.4 Leukozytenzählung und –differenzierung**

Die Bestimmung der Leukozyten erfolgt in zwei voneinander unabhängigen Kanälen, dem Peroxidasekanal und dem Basophilen-Kernsegmentierungskanal. Im Peroxidasekanal werden die Leukozyten im Halogenlicht gezählt und anhand ihres Volumens (Streulichtsignal) und ihrer Peroxidaseaktivität (Absorptionssignal)

differenziert. Durch entsprechende Vorbehandlung der Zellen lassen sich im Ergebnis fünf Zellpopulationen unterscheiden: Lymphozyten (kleine peroxidasenegative Zellen), Monozyten (größere peroxidasenegative Zellen), LUC (large unstained cells, große ungefärbte Zellen, z.B. Blasten, lymphatische Reizformen, Plasmazellen), neutrophile Granulozyten (große gefärbte Zellen) und eosinophile Granulozyten.

Im Basophilen-Kernsegmentierungskanal werden die Leukozyten mittels Laserlichtstreuung in zwei definierten Winkelbereichen gezählt. Während der Vorbehandlung der zu analysierenden Blutprobe werden die Erythrozyten und Thrombozyten lysiert und alle weißen Blutzellen, bis auf die basophilen Granulozyten, einem zytoplasmatischen Stripping (entwickelt von Cremins und Orklin, Bayer Diagnostik, 1992) unterzogen. Die so präparierte Leukozytensuspension besteht nun aus Zellkernen und „ungestrippten“ (lyseresistenten) basophilen Granulozyten und gelangt in die Flusszelle. Das Ergebnis wird zusätzlich als Nukleogramm angezeigt und durch die tierartliche Cluster-Analyse können drei Zellpopulationen (basophile Granulozyten, mononukleäre und polymorphnukleäre Leukozyten) differenziert werden (MEYER, 2005).

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Patientengut**

Als Patientengut gelten Hunde, die im Routineablauf der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen ambulant oder stationär untersucht und behandelt worden sind und bei denen eine Indikation zur hämatologischen Untersuchung bestand. Es wurden Blutproben von gesunden (z.B. Blutspender, Narkose Voruntersuchung für HD-Röntgen) und kranken Tieren genommen, um den Messbereich der Hämatologiesysteme möglichst weit zu testen. In 1,5 Jahren wurden insgesamt 314 auswertbare Blutproben (davon 65 gesund) in die Studie eingeschlossen (Sysmex XT-2000iV, n= 314, pochH-100iV Diff, n= 150).

### **5.1.1 Alter**

Das Blut von Hunden im Alter von 0,2 bis 15,5 Jahren wird untersucht, das Durchschnittsalter beträgt 6,3 Jahre (arithmetischer Mittelwert).

### **5.1.2 Geschlecht**

172 Hunde männlichen Geschlechts (davon 15 kastriert) und 144 weiblichen Geschlechts (davon 17 kastriert) wurden erfasst.

### **5.1.3 Rasse**

Den größten Anteil der Studie stellen mit 35,4% Mischlingshunde dar. Es folgen Rassen wie Deutscher Schäferhund (7,8%), Labrador (6,4%) und Golden Retriever (4%) aber auch die Rassen Deutsche Dogge, Border-Collie, Beagle, Bernersennenhund, Terrier u.a. sind vertreten.

## **5.2 Methoden**

### **5.2.1 Blutprobenentnahme**

Das Blut wird mit einer sterilen Einwegkanüle (0,9 x 40mm, Henke Sass Wol GmbH, Tuttlingen) aus der Vena cephalica antebrachii, Vena saphena oder aus der Vena jugularis gewonnen.

### **5.2.2 Antikoagulanzen**

Das frei ablaufende Blut wird mit 1,3 bzw. 10ml fassenden K<sub>3</sub> - EDTA Röhrchen der Firma Sarstedt, Nümbrecht aufgefangen und antikoaguliert. Bei der Durchführung des Antikoagulanzenvergleich kommen außerdem noch 1,3ml fassende Li-Heparin und Na-Citrat Röhrchen der Firma Sarstedt zum Einsatz.

### **5.2.3 Blutprobenverarbeitung**

Die Messung der Blutproben, sowie die Bestimmung des Hämatokrit erfolgt innerhalb von 4-6h nach Blutentnahme. Die Anfertigung der Blutaussstriche für die manuelle Leukozytendifferenzierung und Retikulozytenzählung erfolgt im gleichen Zeitraum. Vor jeder Blutprobenverarbeitung wird das Probenröhrchen durch mehrmaliges (10x) Über-Kopf-Schwenken gut vermischt.

### **5.2.4 Flag Rules**

Die „Flags“ (Warnmeldungen) werden bei der Blutanalyse in zwei Kategorien eingeteilt: „Morphologische“ und „Technische“ Flags. Tritt bei wiederholter Messung erneut ein technischer Flag auf, wird das Ergebnis abgelehnt und macht eine Gerätewartung erforderlich. Wird von dem Gerät keine Warnmeldung oder ein morphologischer Flag angegeben, werden die Ergebnisse akzeptiert und ausgedruckt.

Das folgende Schema (Abb.14) zeigt die Vorgehensweise einer Blutanalyse an den zu evaluierenden Geräten:



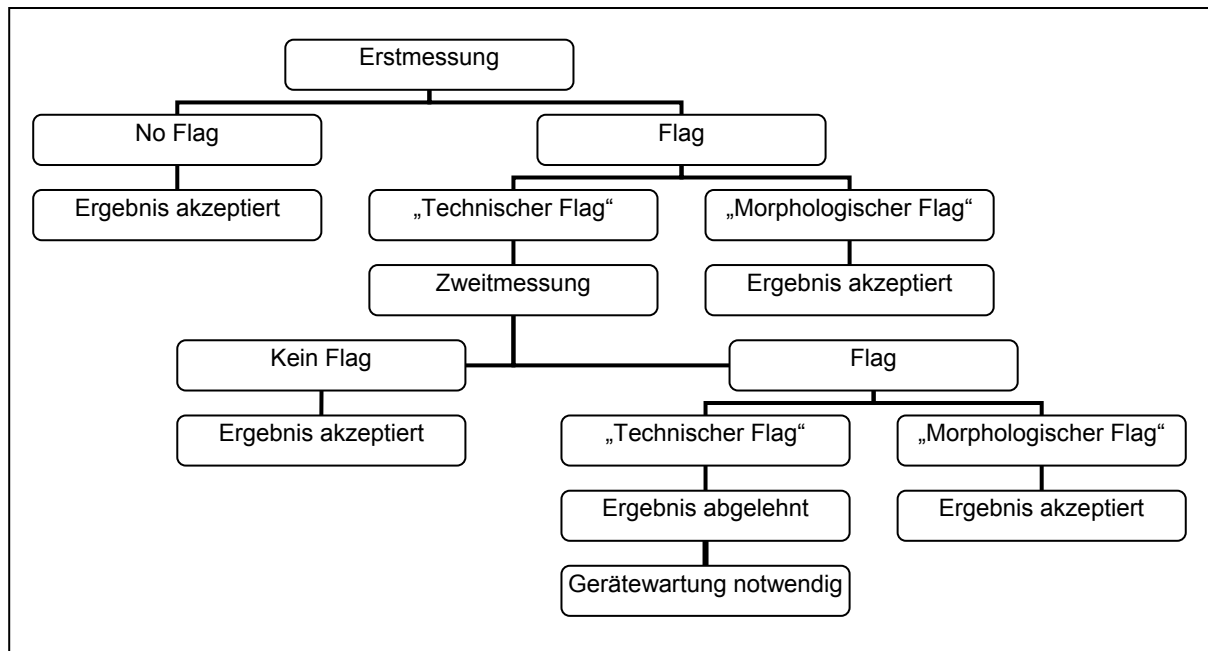


Abb. 14 Vorgehensweise einer Blutprobe für die Tierart Hund (nach BECKER, 2007)

### 5.3 Methodenvergleich

#### 5.3.1 Zentrifuge

Die Bestimmung des Hämatokrits (PCV) erfolgt mittels einer Mikrohämatokritzentrifuge der Firma Hettich Zentrifugen. Von jeder Blutprobe wird eine Doppelbestimmung des Hämatokrits erstellt. Durch schräges Eintauchen der Röhrchen in das Probengefäß wird das Röhrchen mittels Kapillarkraft zu etwa  $\frac{3}{4}$  gefüllt und am unteren Ende mit Kitt verschlossen. Die Zentrifugation erfolgt bei 12000 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten. Anschließend wird der Hämatokritwert mittels Schablone am oberen Rand der Erythrozytensäule von beiden Hämatokritröhrchen abgelesen und der Mittelwert berechnet.

### **5.3.2 Manuelle Differenzierung**

Von jeder Blutprobe werden manuell 3 Blutausstriche zur Überprüfung der mit den automatischen Zellzählgeräten (ADVIA 2120, Sysmex XT-2000iV und pocH-100iV Diff) erstellten Differentialblutbildern angefertigt. Ein kleiner Tropfen Blut wird am Ende eines Objektträgers aufgetragen und mit einem zweiten Objektträger nach Fangen des Tropfens zügig mit leichtem Druck zu einer Fahne ausgezogen.

Nach Lufttrocknung werden alle Ausstriche nach folgender Beschreibung gefärbt:

### **5.3.3 Panoptische Färbung nach PAPPENHEIM (PAN)**

- a) Fixierung und Färbung der Ausstriche mittels May-Grünwald®-Lösung (May-Grünwald®-Lösung modifiziert Nr. 1424, Fa. Merck, Darmstadt) für 3 Minuten.
- b) Abspülen der Färbelösung mit Aqua dest. für 1 Minute.
- c) Gegenfärbung mit Giemsa-Gebrauchslösung (1 Tropfen Giemsa-Lösung 9204, Fa. Merck, Darmstadt auf 1 ml Aqua dest.).
- d) Abspülen der Färbelösung mit Aqua dest. für 1 Minute.
- e) Lufttrocknung der Blutausstriche in schräger Position.

Mit Hilfe des Mikroskopes werden bei 1000 facher Vergrößerung jeweils 200 Zellen differenziert. Das vom Sysmex XT-2000iV und ADVIA 2120 erstellte Retikulozytenergebnis wird manuell mit Hilfe der Supravitalfärbung überprüft.

### **5.3.4 Retikulozytenfärbung (Supravitalfärbung)**

Zur Anfärbung des Retikulums wird die Färbelösung Brilliantkresyl-Blau verwendet. 50µl EDTA- Blut werden zur fertigen Farblösung (50µl) hinzugegeben und vermischt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit und erneuter Vermischung der Probe werden 3 Ausstriche angefertigt und an der Luft getrocknet. Es werden insgesamt 1000 Erythrozyten differenziert und der Anteil an Retikulozyten in Prozent angegeben.

### 5.3.5 Geräte

#### 5.3.5.1 Sysmex pocH-100iV Diff

Der pocH-100iV Diff ist ein Hämatologiesystem für die Labordiagnostik in der tierärztlichen Praxis von der Firma Sysmex Europe GmbH, welches die Blutzellen mittels Impedanzmethode zählt. Neben der Zellzählung liefert das Hämatologiegerät ein 3 Zell-Differentialblutbild der Leukozyten inklusive eosinophiler Granulozyten für Hund und Katze. Die flexible Software Version 00-10 ermöglicht es dem Anwender, zusätzlich zu den vordefinierten Spezies Hund, Katze und Rind auf unkomplizierte Weise bis zu 13 weitere Tierarten zu programmieren. Im Gegensatz zu den beiden anderen Hämatologiesystemen hat der pocH-100iV Diff geringe Abmessungen und ein kompaktes Reagenzsystem, somit ist er mobil einsetzbar und passt in jedes Labor.



Technologie:

Mittels Impedanzmethode mit hydrodynamischer Fokussierung werden RBC, HKT und PLT bestimmt. WBC und HGB werden durch Kombination aus Impedanzmethode und cyanidfreier Photometrie gemessen.

Parameter:

Hund, Katze, anwenderdefinierbare Tierarten:

WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, LYM%,  
 OTHR%, EO%, LYM#, OTHR#, EO#, RDW-SD, RDW-CV,  
 PDW\*, MPV\*, P-LCR\* (\*exkl. Katze)

Rind:

WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, LYM%, OTHR%, EO%, LYM#,  
OTHR#, EO#, RDW-SD, RDW-CV, PDW, MPV, P-LCR

Volumen:

ca. 15 µl Ansaugvolumen

Durchsatz:

ca. 148 Sekunden/Probe

Datenspeicher:

20 Proben inklusive Histogrammen

Abmessungen/Gewicht (B x H x T / kg):

185 x 350 x 460 / 14

Flags:

Warnmeldungen (Flags) sind sogenannte Verdachts- oder Abnormalmeldungen – sie markieren eine Probe

<u>Flag</u>	<u>Erklärung</u>
WL	Fehler am unteren Diskriminator für WBC
WU	Fehler am oberen Diskriminator für WBC
T1	Taldiskriminator T1 nicht bestimmbar
T2	Taldiskriminator T2 nicht bestimmbar
F1	kleine Zellen sind ungenau
F2	mittlere Zellen sind ungenau
F3	große Zellen sind ungenau
RL	Fehler am unteren Diskriminator für RBC
RU	Fehler am oberen Diskriminator für RBC
DW	Verteilungsbreite (20%) kann nicht berechnet werden
MP	Multiple Peaks vorhanden

PL	Fehler am unteren Diskriminator für PLT
PU	Fehler am oberen Diskriminator für PLT

Beispiele der zusätzlich angegebenen Parametermarkierungen:

!	Wert ist ausserhalb der Linearitätsgrenzen
+	Ergebnis ausserhalb des oberen Referenzbereiches
-	Ergebnis ausserhalb des unteren Referenzbereiches
*	Ergebnis ist unzuverlässig
"+++."+	Wert überschreitet den Anzeigebereich
"***. *"	Wert konnte aufgrund eines Analysenfehlers nicht berechnet werden
"---.-"	Wert konnte aufgrund eines Datenfehlers nicht berechnet werden

Mit dem poCH-100iV Diff wird jede Blutprobe entsprechend dem Versuchsprotokoll analysiert. Das Ergebnis wird gespeichert und ausgedruckt. Einmal täglich wird mit entsprechendem Kontrollblut die Qualitätskontrolle durchgeführt. Die Kalibrierung wird vom Hersteller vorgenommen.

### 5.3.5.2 Sysmex XT-2000iV

Der Sysmex XT-2000iV ist ein vollautomatisches Hämatologiesystem der Firma Sysmex Europe GmbH, welches zur Blutzellzählung- und differenzierung die Impedanzmethode sowie die Fluoreszenzdurchflusszytometrie nutzt. Mittels Durchflusszytometrie/ Hydrodynamischer Fokussierung können Zellgröße und das Kern-Plasmaverhältnis bestimmt werden.



Eine weitere Methode zur Zelldifferenzierung ist die Bestimmung der Zellaktivität anhand des DNA- bzw. RNA- Gehaltes der Zellen, indem diese Strukturen mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden. Es wird ein 5 Zell-Differentialblutbild erstellt, inklusive Retikulozyten-Zählung und -differenzierung, sowie zweifacher Thrombozytenbestimmung.

Neben den acht bereits vordefinierten Tierarten (Hund, Katze, Pferd, Maus, Kaninchen, Ratte, Meerschweinchen, Affe) sind beliebig viele weitere Spezies programmierbar.

Parameter für jede Tierart:

WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, RDW-CV, RDW-SD, MPV, PDW, P-LCR, PCT, NEUT%, LYMPH%, MONO%, EO%, BASO%, NEUT#, LYMPH#, MONO#, EO#, BASO#, RET%, RET#, LFR, MFR, HFR, IRF, PLT-O

Durchsatz im Modus CBC + DIFF + RET:

80 Proben/h

Volumen im Modus manuell offen:

85µl Ansaugvolumen

Flags:

Warnmeldungen (Flags) sind sogenannte Verdachts- oder Abnormalmeldungen – sie markieren eine Probe POSITIV:

#### *POSITIV*

DIFF	Hinweis auf Abweichungen in der Zelldifferenzierung
MORPH	Hinweis auf morphologisch abnormale Zellen
COUNT	Hinweis auf Abweichung in der Zellzählung

#### *FEHLER*

FUNC	Hinweis auf Analysenfehler
RESULT	Hinweis auf Analysenfehler im Zusammenhang mit der Probenansaugung, wie z.B. „Sample Not Asp Error“, „Low Blood Volume“ and „Low Count Error“

Beispiele der zusätzlich angegebenen Parametermarkierungen:

+, -	Daten ausserhalb der Referenzintervalle
@	Daten ausserhalb des Linearitätsbereiches
*	Daten sind anzuzweifeln
"---"	keine Analyse

Am Sysmex XT-2000iV wird die Einstellung Hund und Testanforderung CBC/DIFF/RET (kleines Blutbild, Differentialblutbild, Retikulozyten) gewählt. Jede Blutprobe wird entsprechend dem Versuchsprotokoll analysiert, das Ergebnis gespeichert und ausgedruckt. Vor Beginn der Analysen werden entsprechend den Herstellerangaben die Qualitätskontrollen durchgeführt. Kalibrierung des Gerätes erfolgt durch Mitarbeiter der Firma Sysmex.

### 5.3.5.3 ADVIA® 2120

In der Studie wird der ADVIA® 2120 als Referenzgerät genutzt. Es handelt sich um die 2. Generation des ADVIA™120 von der Firma Siemens Healthcare Diagnostics. Wie sein Vorgänger ist es ein vollautomatisches Hämatologiesystem, welches in vielen Einsendelaboren oder Universitätstierkliniken eingesetzt wird.



Zur Blutzelldifferenzierung nutzt das Gerät unterschiedliche Messtechniken, die auf dem optoelektronischen Messprinzip beruhen. Erythrozyten, Thrombozyten und Retikulozyten werden mit Hilfe von Doppel-Laser-Streulicht, das Leukozytenvolumen mit der Halogen-streulichtmessung und die Leukozyten-differenzierung und die Retikulozyten mit Hilfe der Absorptionsmessung analysiert. Eine Multispeziesssoftware beinhaltet 21 unterschiedliche Tierarten.

Parameter:

WBC, RBC, HB, HKT, MCV, MCH, MCHC, CHCM, EVB, HVB, CH, CHVB, PLT, LEUP

(absolut und %) NEUT, LYMPH, MONO, EOS, BASO, LUC (Large unstained cells), RETI (absolute und %), MCVr, CHCMr, CHr

Durchsatz im Modus:

120 (KI. BB / DIFF ) bzw. 74 (KI. BB / DIFF / RETI) Proben / Stunde

Ansaugvolumen manuell offenes Röhrchen:

175 µL



Am ADVIA®2120 wird die Einstellung Hund und die Testanforderung KI. BB/DIFF/RETI (kleines Blutbild, Differentialblutbild, Retikulozyten) gewählt. Jede Blutprobe wird einmal analysiert, das Ergebnis gespeichert und ausgedruckt. Täglich vor Beginn des Messeinsatzes wird eine Qualitätskontrolle mit humanen Kontrollbluten der Firma Siemens durchgeführt. Die Kalibration des ADVIA®2120 wird entsprechend den Herstellerangaben von Mitarbeitern der Firma Siemens durchgeführt.

#### **5.4 Versuchprotokoll**

Im Folgenden werden die zur Evaluation von Hämatologiesystemen erforderlichen Versuche dargestellt. Die Messungen werden am Sysmex XT-2000iV und poch-100iV Diff durchgeführt.

##### **5.4.1 Präzision**

Die Präzision der Messungen beider Hämatologiesysteme wird durch folgende Messmethode überprüft:

###### **5.4.1.1 Präzision innerhalb der Serie**

Hierzu wird je eine Blutprobe 25x an den Hämatologiesystemen SysmexXT-2000iV und poch-100iV Diff gemessen. Die Ergebnisse für Blutzellzählung, Retikulozytenzählung (nur am Sysmex XT-2000iV) und Blutzelldifferenzierung überprüfen die Präzision innerhalb der Serie.

#### **5.4.2 Linearität und Carry over**

Linearität und Carry over werden aus derselben Hundebloodprobe für die Parameter WBC, RBC und HGB bestimmt. 80ml K<sub>3</sub>EDTA antikoaguliertes Vollblut wird bei Zimmertemperatur mit 830 Umdrehungen/Minute für 15 Minuten zentrifugiert. Im Anschluß wird das WBC- reiche Blutplasma abpipetiert. Nun wird die Probe erneut bei 830 Umdrehungen/Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Der nun entstehende Überstand bildet den 0%-Pool (zellarmes-freies Blutplasma). Aus dem Sediment (100%-Pool) werden durch Resuspension die unterschiedlichen Verdünnungsstufen hergestellt (0%, 25%, 50%, 75%, 100%).

Linearität und Verschleppung werden in einem Arbeitsgang ermittelt. Es erfolgt zunächst die Bestimmung der Linearität durch direkt aufeinander folgende Doppelmessung der einzelnen Verdünnungsstufen aufsteigend. Direkt im Anschluss erfolgt die Untersuchung des „carry over“ (Anteil der Verschleppung einzelner Probenbestandteile): 7-mal jeweils einer 100%-Pool-Messung und zwei 0%-Pool-Messungen.

Die Anreicherung der Erythrozyten (RBC) erfolgt auf ähnliche Weise wie für die Leukozyten (WBC). Vier 10ml K<sub>3</sub>EDTA antikoagulierte Blutprobenröhrchen werden bei 4°C für 25 Minuten bei 2300 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Im Anschluss wird das plättchenfreie Plasma abpipetiert (0%-Pool). Durch Vermischen eines Anteils des Sediments mit dem 0%-Pool werden die Verdünnungsstufen (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) hergestellt und im Anschluss eine Doppelmessung der einzelnen Verdünnungsstufen an den einzelnen Geräten durchgeführt.

### **5.4.3 Antikoagulanzenvergleich**

Ziel dieser Untersuchung ist der Einfluss von unterschiedlich verwendeten Antikoagulanzen auf die Messergebnisse beim Sysmex XT-2000iV und pocH-100iV Diff. Von 10 Hunden wird das Blut mittels K<sub>3</sub>EDTA-, Na-Citrat- und Li-Heparin-Röhrchen aufgefangen. Im Anschluss erfolgt eine Dreifachmessung jeder Probe, wobei die Proben eines Patienten direkt hintereinander gemessen werden. Die Ergebnisse werden gespeichert und ausgedruckt.

### **5.4.4 Blutalterung und Lagerungstemperatur**

Diese Verlaufsuntersuchung dient zur Stabilitätsüberprüfung der Blutzellzählung, -differenzierung und Retikulozytenzählung (nur am Sysmex XT-2000iV) bei 4°C (Kühlschranktemperatur) und 22°C (Raumtemperatur). Das Blut von 10 Hunden wird in zwei K<sub>3</sub>EDTA-Röhrchen (jeweils 8ml) aufgefangen und im Anschluss untersucht und entsprechend gelagert. Die Messungen erfolgen über einen Zeitraum von 72 Stunden (Zeitpunkt der Messungen: 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden).

## **5.5 Statistik**

Die Messergebnisse werden mit dem Statistikprogramm Microsoft Excel mit Analyse-*it*® Version 2.2 und GraphPadPrism Version 4.0 ausgewertet.

### **5.5.1 Korrelations- und Regressionsanalyse**

Bei der Auswertung des Methodenvergleichs werden für alle Parameter der Blutzellzählung und -differenzierung beider Hämatologiesysteme Lineare Regression, Spearman Korrelation (bei normal verteilten Daten) und Passing-Bablok Regression ( bei nicht normal verteilten Daten) berechnet, sowie eine Bland-Altman-Analyse durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) und die Standardabweichung

der Linearen Regression, der Y-Intercept und Slope mit 95% Konfidenzintervall wird von Passing-Bablok Regression errechnet und der Bias mit 95% Limits of agreement ermittelt. Die Darstellung erfolgt mit Hilfe zweier Graphiken:

- Korrelationsdiagramm mit Hauptkomponentengerade, Angabe von Regressionsgleichung und Korrelationskoeffizienten (R). Entspricht  $R = 1$  besteht eine vollkommene Übereinstimmung der Messwertpaare.
- Bland / Altmandiagramm als Punktwolkendiagramm. Es werden die Differenzen der beiden Messmethoden gegen den Mittelwert der beiden Methoden aufgetragen. Es erfolgt zusätzlich die Darstellung der horizontalen Geraden für die Grenzen der Übereinstimmung – („Limits of agreement“) – entsprechen dem Mittelwert der Differenzen  $\pm 1,96$  facher Standardabweichung, die 95% aller Paardifferenzen einschließt. Der Bias gibt den Wert an, in dem sich zwei Geräte oder Messmethoden durchschnittlich unterscheiden. Dies ermöglicht dem Beobachter festzustellen, um wieviel z.B. der pochH-100iV Diff im Durchschnitt höher oder niedriger misst als die Referenzmethode und in welchem absoluten Wertebereich dies der Fall ist.

### **5.5.2 Varianzanalyse**

Die Überprüfung der Präzision des pochH-100iV Diff und des XT-2000iV für die Ergebnisse der Wiederholungsmessungen innerhalb der Serie erfolgt mittels einfaktorieller Varianzanalyse. Die Ermittlung des Einflusses der einzelnen Antikoagulanzen erfolgt mittels einfaktorieller Varianzanalyse und einem paarweisen Vergleich anhand des t-Tests für verbundene Stichproben unter Anwendung des vergleichsbezogenen Signifikanzniveaus (Bonferroni-Adjustierung). Eine zweifaktorielle Varianzanalyse wird zur Bewertung der Verlaufsuntersuchung hinsichtlich Lagerungstemperatur und Blutalterung durchgeführt.

### 5.5.3 Signifikanz

Die Angabe der Signifikanz  $p$  erfolgt nach folgender Definition:

$p \leq 0,001$	hoch signifikant
$p \leq 0,01$	signifikant
$p \leq 0,05$	schwach signifikant
$p > 0,05$	nicht signifikant, n.s.

### 5.5.4 ROC-Kurven-Analyse

Zur Überprüfung der Richtigkeit des pochH-100iV Diff eine Eosinophilie richtig zu erkennen, wird eine ROC-Kurven-Analyse (Receiver Operating Characteristic-Kurven-Analyse) durchgeführt. Ausgangspunkt zur Erklärung der ROC-Kurven-Analyse sind die Begriffe Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Wert.

**Sensitivität:** Die Fähigkeit eines Prüfverfahrens, bei einer vorher bestimmten Grenzsetzung (Cut-Off-Wert) ein vorhandenes Faktum zu erkennen (also richtig-positiv bezogen auf die ausschlaggebende Zielgröße).

**Spezifität:** Die Fähigkeit eines diagnostischen Verfahrens, Nicht-Kranke (Gesunde) zu erkennen: Eine richtige negative Prognose zu stellen (FASSL, 1999).

In der ROC-Kurve sind die Wertepaare von Spezifität und Sensitivität eines diagnostischen Tests für alle möglichen Cut-Off-Punkte innerhalb des Messbereiches aufgetragen. Der diagnostische Test weist eine Trennschärfe auf, d.h. der pochH-100iV Diff kann eine Eosinophilie richtig erkennen, wenn sich die Kurve signifikant von der Diagonalen unterscheidet. Ein Gerät ohne jegliche Trennschärfe würde eine Diagonale zeigen. Die Trennschärfe ist umso exakter, je weiter sich die ROC-Kurve in die linke obere Ecke bewegt (hohe Sensitivität und Spezifität).

Die *AUC (area under the curve)* ist ein zusammenfassendes Maß für die Güte des Gerätes und kann Werte zwischen 0,5 und 1 betragen, wobei ein höherer Wert die bessere Güte anzeigt (HANLEY JA, MCNEIL BJ. 1982).

## **6 ERGEBNISSE**

### **6.1 Präzision**

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Präzisionsstudie innerhalb der Serie dargestellt. Mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse wird bei den normalverteilten Variablen der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$ , die Standardabweichung  $S$  und der Variationskoeffizient  $CV$  (%) berechnet.

#### **6.1.1 Präzision innerhalb der Serie, poch-100iV Diff und XT-2000iV**

Die statistische Auswertung der Parameter für beide Geräte der Blutzellzählung, die Retikulozytenzählung und die Blutzelldifferenzierung werden im Folgenden getrennt behandelt.

### 6.1.1.1 Blutzellzählung

In den Tabellen 1 und 2 sind die Ergebnisse ausgewählter Parameter der Blutzellzählung des pocH-100iV Diff und des XT-2000iV aufgelistet.

Tabelle 1: Präzision des pocH-100iV Diff innerhalb der Serie für die Parameter der Blutzellzählung bei der Tierart Hund, n=1, 25 fach- Messung, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $\bar{x} \pm S$ ), Variationskoeffizient (CV) in %.

Parameter <b>pocH-100iV Diff</b>	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$	Variationskoeffizient CV (%)
WBC	$10^9/L$	$12,7 \pm 0,16$	1,2
RBC	$10^{12}/L$	$7,1 \pm 0,06$	0,9
HGB	mmol/L	$17,2 \pm 0,19$	1,1
HKT	L/L	$0,49 \pm 0,01$	1,1
MCV	Fl	$68,5 \pm 0,31$	0,4
MCH	fmol	$2,4 \pm 0,04$	1,0
MCHC	mmol/L	$35,2 \pm 0,35$	1,0
PLT	$10^9/L$	$122,6 \pm 6,02$	4,9

Tabelle 2: Präzision des XT-2000iV innerhalb der Serie für die Parameter der Blutzellzählung bei der Tierart Hund, n=1, 25 fach- Messung, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $\bar{x} \pm S$ ), Variationskoeffizient (CV) in %.

Parameter <b>XT-2000iV</b>	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$	Variationskoeffizient CV (%)
WBC	$10^9/L$	$12,3 \pm 0,15$	1,2
RBC	$10^{12}/L$	$7,4 \pm 0,03$	0,4
HGB	mmo/L	$17,3 \pm 0,11$	0,6
HKT	L/L	$0,51 \pm 0,002$	0,5
MCV	Fl	$68,8 \pm 0,22$	0,3
MCH	Fmol	$2,3 \pm 0,02$	0,7
MCHC	mmol/L	$34,1 \pm 0,27$	0,8
PLT	$10^9/L$	$120,8 \pm 6,55$	5,4

Wie aus den Tabellen hervorgeht, zeichnen sich bei beiden Hämatologiesystemen für die Parameter der Blutzählung mit Variationskoeffizienten zwischen 0,4 und 1,2 bzw. 0,3 und 1,2 sehr gute Ergebnisse ab. Für die Thrombozytenzählung liegen die Variationskoeffizienten bei 4,9 bzw. 5,4 und sind ebenfalls als sehr gut zu bewerten.

### 6.1.1.2 Blutzelldifferenzierung

Die Präzisionen innerhalb der Serie für die absoluten und relativen Parameter der Blutzelldifferenzierung der beiden Hämatologiesysteme sind den folgenden Tabellen 3 und 4 zu entnehmen.

Tabelle 3: Präzision des pocH-100iV Diff innerhalb der Serie für die Parameter der Blutzelldifferenzierung bei der Tierart Hund, n=1, 25 fach- Messung, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $\bar{x} \pm S$ ), Variationskoeffizient (CV) in %.

Parameter <b>pocH-100iV Diff</b>	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$	Variationskoeffizient CV (%)
Lymphozyten	%	26,1 $\pm$ 0,56	2,2
OTHER (Monozyten, Neutrophile G.)	%	68,2 $\pm$ 0,83	1,2
Eosinophile G.	%	5,7 $\pm$ 0,62	10,7
Lymphozyten	10 <sup>9</sup> /L	3,3 $\pm$ 0,10	2,9
OTHER (Monozyten, Neutrophile G.)	10 <sup>9</sup> /L	8,7 $\pm$ 0,16	1,8
Eosinophile G.	10 <sup>9</sup> /L	0,7 $\pm$ 0,09	12,2



Tabelle 4: Präzision des XT-2000iV innerhalb der Serie für die Parameter der Blutzellzählung bei der Tierart Hund, n=1, 25 fach- Messung, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $\bar{x} \pm S$ ), Variationskoeffizient (CV) in %.

Parameter <b>XT-2000iV</b>	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$	Variationskoeffizient CV (%)
Neutrophile G.	%	55,2 $\pm$ 0,65	1,2
Lymphozyten	%	28,3 $\pm$ 0,54	1,9
Monozyten	%	7,4 $\pm$ 0,39	5,2
Eosinophile G.	%	9,0 $\pm$ 0,30	3,4
Neutrophile G.	10 <sup>9</sup> /L	6,8 $\pm$ 0,10	1,4
Lymphozyten	10 <sup>9</sup> /L	3,5 $\pm$ 0,89	2,6
Monozyten	10 <sup>9</sup> /L	0,9 $\pm$ 0,04	4,8
Eosinophile G.	10 <sup>9</sup> /L	1,1 $\pm$ 0,04	3,9

Die Präzisionen für die absoluten Zellzahlen und prozentualen Angaben verhalten sich an beiden Hämatologiesystemen kongruent. Für den pochH-100iV Diff ist die Präzision der Eosinophilen Granulozyten (CV = 12,2%) nur mäßig, währenddessen die Präzision der Lymphozyten mit einem Variationskoeffizienten mit 2,9% als sehr gut zu bezeichnen ist.

Der XT-2000iV zeigt für sein gesamtes Differentialblutbild gute bis sehr gute Präzisionsergebnisse (CV = 1,4% bis CV = 4,8%).

### 6.1.1.3 Retikulozytenzählung

Für die Retikulozytenzählung haben sich folgende Präzisionen am XT-2000iV, der pochH-100iV Diff unterstützt diese Funktion nicht, ergeben:

Tabelle 5: Präzision des XT-2000iV innerhalb der Serie für die Parameter der Retikulozytenzählung bei der Tierart Hund, n=1, 25 fach- Messung, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $\bar{x} \pm S$ ), Variationskoeffizient (CV) in %.

Parameter	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$	Variationskoeffizient CV (%)
XT-2000iV			
Retikulozyten	%	10,6 $\pm$ 0,81	7,7
Retikulozyten	10 <sup>9</sup> /L	7,8 $\pm$ 0,60	7,8

Die Variationskoeffizienten für die relative (CV = 7,7%) und absolute (CV = 7,8%) Retikulozytenzahl sind als sehr gut zu bewerten (siehe Kapitel 7.1.1.3).

## 6.2 Methodenvergleich

Um die Richtigkeit der Messergebnisse des pochH-100iV Diff und des XT-2000iV zu überprüfen, werden diese mit den Messergebnissen der Referenzgeräte verglichen. Zuerst werden die Parameter der Blutzellzählung abgehandelt und im Anschluss folgen die Parameter der Blutzelldifferenzierung. Damit eine Übersichtlichkeit gewahrt werden kann, werden hauptsächlich ausgesuchte Diagramme von beiden zu evaluierenden Geräten dargestellt (die beigefügte CD enthält alle Graphiken der Regression- und Bland-Altman-Analyse).

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse der Linearen Regression, Passing-Pablok Regression und der Bland-Altman-Analyse für die Parameter der Blutzellzählung und der Blutzelldifferenzierung zusammengefasst.

### 6.2.1 Richtigkeit der Blutzellzählung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Methodenvergleichs für die Parameter WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC und RET dargestellt. Verglichen wurde der pochH-100iV Diff und der XT-2000iV mit dem ADVIA2120 und der Hämatokritzentrifuge als Referenzgeräte. Die Prüfung der Richtigkeit der Ergebnisse der Retikulozytenzählung erfolgte mittels der Supravitalfärbung mit Brillantkresylblau (1000 gezählte Zellen). In der Tabelle 6 sind die Ergebnisse des Vergleichs der Messmethoden für den pochH-100iV Diff und in der Tabelle 7 die Ergebnisse des Vergleichs der Messmethoden für den XT-2000iV ersichtlich.

Tabelle 6: Korrelation der Parameter der Blutzellzählung für pochH-100iV Diff mit denen des ADVIA2120; r = Korrelationskoeffizient; slope = Steigung der Regressionsgleichung; Y-intercept = Nulldurchgang der Regressionsgleichung; Bias = Systematischer Fehler; 95% CI = 95% Vertrauensintervall; n = Anzahl der Proben

Spezies	Hund; n = 150				
Parameter <b>pochH-100iV Diff</b>	R	Slope	Y-intercept	Bias	95% Limits of agreement
WBC ( $10^9/L$ )	0,99	1,04	-0,04	0,56	-1,54 - 2,67
RBC ( $10^{12}/L$ )	0,98	1,02	-0,11	0,04	-0,47 – 0,54
HGB (mg/dL)	0,75	0,78	0,45	-1,13	-4,8– 2,54
HCT (L/L)	0,98	0,93	0,00	-0,03	-0,06 – 0,01
MCH (pg) *	0,63	0,86	0,17	-0,02	-0,27 – 0,24
MCHC (g/dL) *	0,33	0,65	7,60	-0,03	-3,98 – 3,91
MCV (fL)	0,89	0,97	0,96	-0,55	-4,43 – 3,33
PLT ( $10^9/L$ )	0,93	0,97	-24,58	-36,51	-138,29 – 65,28

\*Vergleich mit Ergebnissen des ADVIA120, aufgrund unterschiedlicher HGB-Bestimmung siehe Kapitel 7.1.2.1

Wie aus der Tabelle 6 ersichtlich ist, werden für die Parameter WBC, RBC und HCT für den pochH-100iV Diff sehr gute Korrelationen ( $r \geq 0,98$ , Bias = -0,03 bis 0,56) festgestellt. Gute bis mäßige Korrelationen finden sich für die Parameter PLT ( $r = 0,93$ ; Bias = -36,51) und MCV ( $r = 0,89$ ; Bias = -0,55). Für den Parameter MCHC ergibt sich eine sehr schlechte Übereinstimmung.

Abbildung 18 zeigt ein Beispiel einer sehr guten Übereinstimmung der mit beiden Methoden erzielten Ergebnisse, die Daten des pochH-100iV Diff für den Parameter WBC im Vergleich zu den Werten des ADVIA2120.

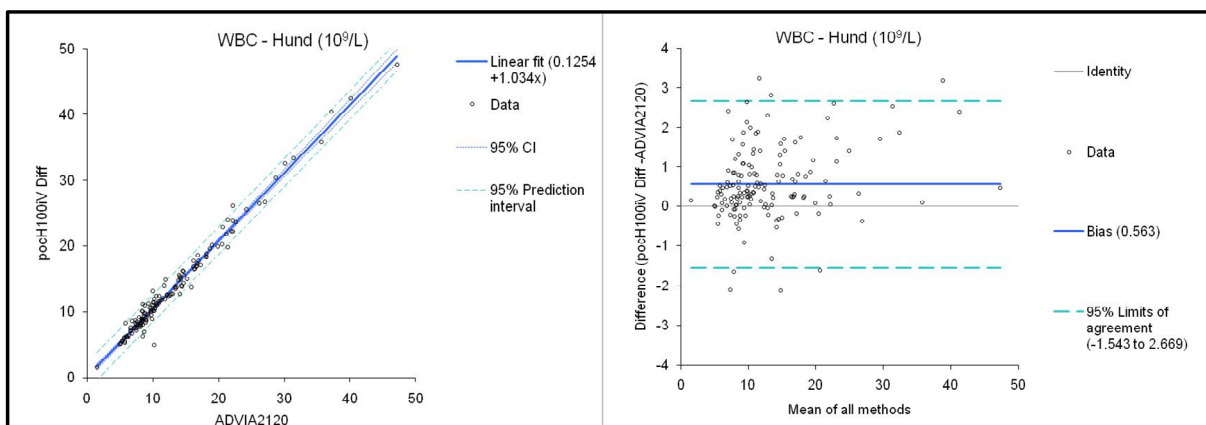


Abbildung 18: Korrelations- und Blant / Altmandiagramm für den Vergleich pochH-100iV Diff / ADVIA2120 für die Leukozytenzählung WBC, Tierart: Hund, n= 150

Das Bland / Altmandiagramm der Abbildung 18 verdeutlicht den Vergleich der beiden Messmethoden in einem Punktdiagramm. Es sind die Differenzen der beiden Messmethoden gegen den Mittelwert der beiden Messmethoden aufgetragen. Zusätzlich sind die Grenzen der Übereinstimmung - (Limits of agreement; hellblaue Linien) – entsprechen dem Mittelwert der Differenz  $\pm 1,96$  facher Standardabweichung, die 95% aller Paardifferenzen einschließt – dargestellt.

Wie in dieser Abbildung ersichtlich ist, liegen die Messergebnisse beinahe alle in dem Bereich der klinisch irrelevanten Abweichung (Limits of agreement), somit erzielt der pochH-100iV Diff ein sehr gutes Ergebnis für den Parameter der Leukozytenzählung.

Die folgende Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der Blutzellzählung des Vergleichs XT-2000iV mit dem ADVIA2120.

Tabelle 7: Korrelation der Parameter der Blutzellzählung für XT-2000iV mit denen des ADVIA2120; r = Korrelationskoeffizient; slope = Steigung der Regressionsgleichung; Y-intercept = Nulldurchgang der Regressionsgleichung; Bias = Systematischer Fehler; 95% CI = 95% Vertrauensintervall; n = Anzahl der Proben

Spezies	Hund; n = 314				
Parameter <b>XT-2000iV</b>	r	Slope	Y- intercept	Bias	95% Limits of agreement
WBC ( $10^9/L$ )	1,00	1,01	-0,17	0,01	-1,30 – 1,33
RBC ( $10^{12}/L$ )	0,98	1,10	-0,38	0,22	-0,34 – 0,78
HGB (mg/dL)	0,82	1,20	-0,02	1,06	-2,01 – 4,12
HCT (L/L)	0,98	1,03	0,00	0,01	-0,03 – 0,05
MCH (pg)*	0,73	0,92	0,09	-0,03	-0,21 – 0,16
MCHC (g/dL)*	0,48	0,96	-0,25	-1,04	-4,01 – 1,93
MCV (fL)	0,91	1,22	-13,01	2,04	-2,61 – 6,70
PLT ( $10^9/L$ )	0,98	0,83	-3,80	-56,60	-136,40 – 23,28

\*Vergleich mit Ergebnissen des ADVIA120, aufgrund unterschiedlicher HGB-Bestimmung siehe Kapitel 7.1.2.1

Wie aus der Tabelle 7 ersichtlich ist, werden für die Parameter WBC, RBC, HCT und PLT des XT-2000iV sehr gute Korrelationen ( $r \geq 0,98$ , Bias = -56,56 bis 0,22) festgestellt. Gute Korrelationen finden sich für die Parameter HGB ( $r = 0,82$ ; Bias = 1,06) und MCV ( $r = 0,91$ ; Bias = 2,04). Für die Parameter MCH und MCHC ergeben sich mäßige Übereinstimmungen (siehe Kapitel 7.1.2.1).

Abbildung 19 zeigt ein Beispiel einer sehr guten Übereinstimmung der mit beiden Methoden erzielten Ergebnisse, die Daten des XT-2000iV für den Parameter HCT im Vergleich zu den Werten der Hämatokritzentrifuge (PCV).

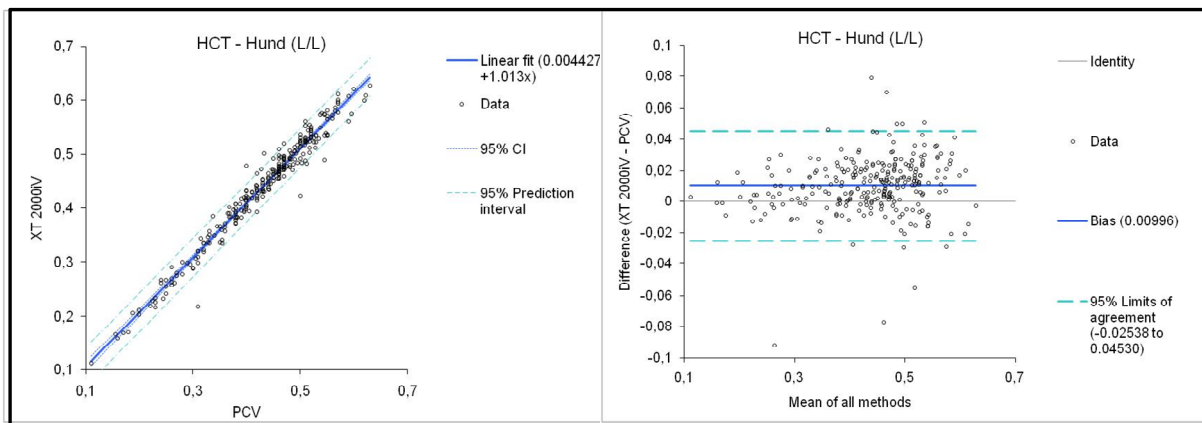


Abbildung 19: Korrelations- und Bland / Altmandiagramm für den Vergleich XT-2000iV / Hämatokritzentrifuge für den Parameter PCV, Tierart: Hund, n=314.

In der Abbildung 19 ist im Korrelationsdiagramm der sehr gute Zusammenhang der beiden Messmethoden anhand der Lage der Hauptkomponentengeraden unter Angabe der Regressionsgleichung und des Korrelationskoeffizienten (R) ersichtlich. Bei einer vollkommenen Übereinstimmung der Messwertpaare entspricht  $R = 1$ . Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet  $y = m \cdot x + b$ , wobei  $m$  dem linearen Regressionskoeffizienten entspricht und  $b$  den Y-Achsenabschnitt bezeichnet.

### 6.2.2 Richtigkeit der Blutzellendifferenzierung

Bei der Blutzellendifferenzierung wurde als Referenzmethode die Panoptische Färbung nach Pappenheim eingesetzt. Von jedem Ausstrich wurden 200 Zellen manuell differenziert und den Ergebnissen des pocH-100iV Diff und des XT-2000iV gegenübergestellt. Verglichen wurden die prozentualen Anteile der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und Monozyten mit der Gesamt-Leukozytenzahl. Der pocH-100iV Diff erstellt ein 3-Zell-Differenzialblutbild, somit wurden die prozentualen Anteile der Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und des Parameter „OTHR“ (enthält neutrophile Granulozyten, Monozyten, eventuell vorhandene basophile Granulozyten) mit der Gesamt-Leukozytenzahl verglichen. Die Ergebnisse werden in den folgenden Tabellen 8+9, zunächst für den pocH-100iV Diff und im Anschluss für den XT-2000iV, dargestellt.

Tabelle 8: Vergleich der Ergebnisse des pocH-100iV Diff mit der manuellen Methode für die Blutzelldifferenzierung;  $r$  = Korrelationskoeffizient; slope = Steigung der Regressionsgleichung; Y-intercept = Nulldurchgang der Regressionsgleichung; Bias = Systematischer Fehler; 95% CI = 95% Vertrauensintervall; n = Anzahl der Proben

Spezies	Hund; n = 107				
Parameter <b>pocH-100iV Diff</b>	r	slope	Y-intercept	Bias	95% Limits of agreement
OTHR (%)	0,79	0,87	12,18	2,02	-13,43–17,47
Lymphozyten (%)	0,85	0,85	2,46	0,44	-11,86–12,73
Eosinophile Granulozyten (%)	0,22	0,97	3,33	3,48	-5,86–12,83

Wie aus der Tabelle 8 entnommen werden kann, wurde für den Parameter OTHR, der hauptsächlich die neutrophilen Granulozyten (+ Monozyten) repräsentieren soll und die Lymphozyten eine nur mäßige Korrelation ( $r \leq 0,85$ ; Bias: 0,44-2,02) festgestellt. Auffällig ist die fehlende Übereinstimmung der Resultate bei der Eosinophilendifferenzierung mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,22$ .

Die folgende Abbildung 20 zeigt die schlechte Übereinstimmung der Messergebnisse für die eosinophilen Granulozyten.

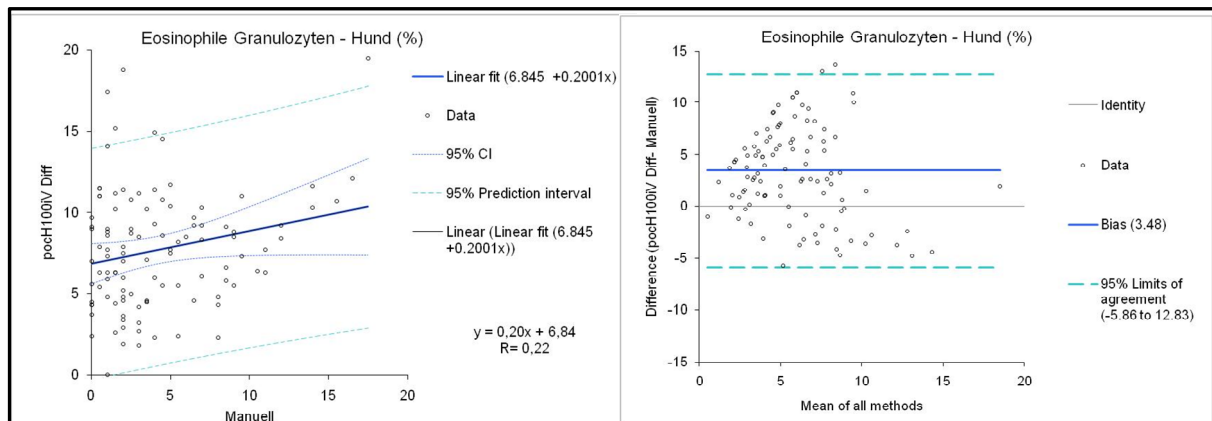


Abbildung 20: Korrelations- und Bland / Altmandiagramm für den Vergleich pocH-100iV Diff / manuelle Differenzierung für die eosinophilen Granulozyten, Tierart: Hund, n=108.

Zusammengefasst erreicht der pocH-100iV Diff nur ein ausreichendes Ergebnis hinsichtlich der Blutzelldifferenzierung. Im Vergleich zur Blutzellzählung sind nur 108 Blutproben von ursprünglich 122 Proben des pocH-100iV Diff in die Statistik eingeflossen, da der pocH-100iV Diff 14x kein Differenzialblutbild erstellt hat.

Im Anschluss werden die Ergebnisse des XT-2000iV zur Richtigkeit der Blutzelldifferenzierung in Tabelle 9 präsentiert.



Tabelle 9: Vergleich der Ergebnisse des XT-2000iV mit der manuellen Methode für die Blutzelldifferenzierung;  $r$  = Korrelationskoeffizient; slope = Steigung der Regressionsgleichung; Y-intercept = Nulldurchgang der Regressionsgleichung; Bias = Systematischer Fehler; 95% Limits of agreement; n = Anzahl der Proben

Spezies	Hund; n = 233				
Parameter <b>XT-2000iV</b>	r	slope	Y-intercept	Bias	95% Limits of agreement
Neutrophile Granulozyten (%) n = 235	0,93	1,00	-6,07	-6,00	-15,65 - 3,65
Lymphozyten (%) n = 235	0,89	0,94	3,04	1,91	-8,24 -12,06
Monozyten (%)	0,40	1,55	2,95	5,37	-4,11 -14,85
Eosinophile Granulozyten (%)	0,73	0,90	0,15	0,15	-5,85 - 6,15

Wie aus der Tabelle 9 hervorgeht, erzielt der XT-2000iV im Methodenvergleich der Blutzelldifferenzierung gute bis sehr gute Korrelationen für Lymphozyten und neutrophile Granulozyten ( $r \geq 0,89$ , Bias: -6,00 – 1,91). Eine mäßige Übereinstimmung der Methodenergebnisse lässt sich für die eosinophilen Granulozyten und die Monozyten feststellen.

Die folgenden Abbildungen zeigen die mäßige bzw. die sehr gute Übereinstimmung der Messergebnisse für die eosinophilen Granulozyten und der neutrophilen Granulozyten.

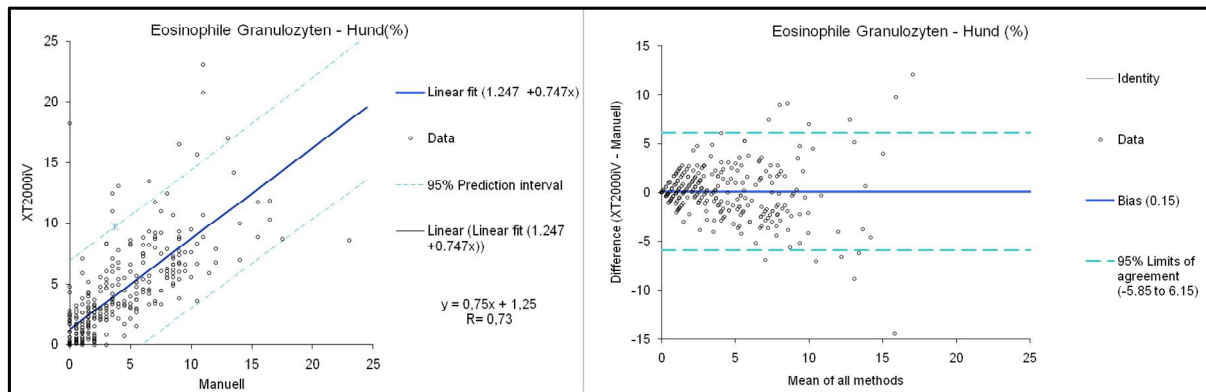


Abbildung 21: Korrelations- und Bland / Altmandiagramm für den Vergleich XT-2000iV / manuelle Differenzierung für die eosinophilen Granulozyten, Tierart: Hund, n=284.

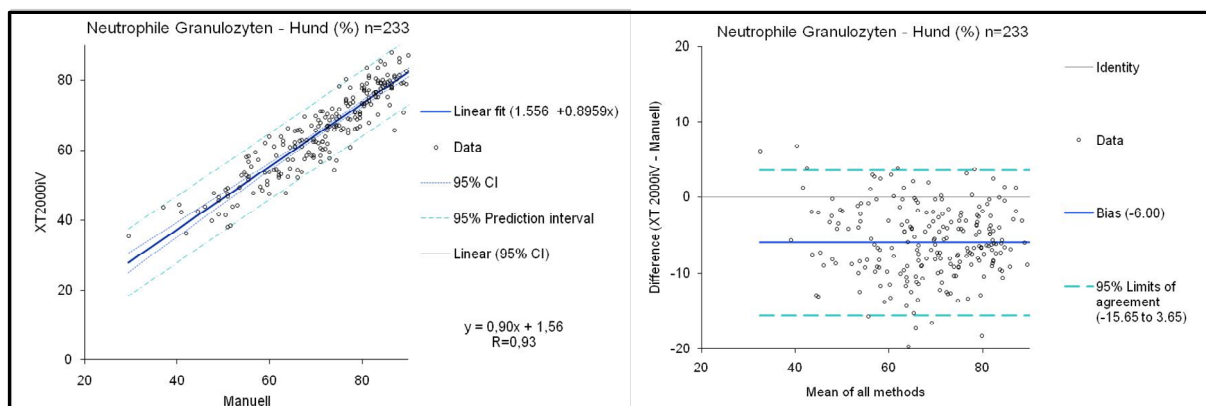


Abbildung 22: Korrelations- und Bland / Altmandiagramm für den Vergleich XT-2000iV / manuelle Differenzierung für die Neutrophilen Granulozyten, Tierart: Hund, n=233.

Auch der XT-2000iV hat mehrfach kein Differenzialblutbild erstellt, so daß die Anzahl der in die Statistik eingegangenen Proben von 284 auf 233 reduziert wurde. Auf die Problematik der Korrelationsanalyse bei Differenzierung von Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten am XT-2000iV wird zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen (siehe Kapitel 7.1.2.2).

### 6.2.3 Richtigkeit der Retikulozytenzählung

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs für die automatische Retikulozytenzählung des XT-2000iV mit der manuellen Retikulozytenzählung sind der folgenden Tabelle 10 zu entnehmen. Der pochH-100iV Diff unterstützt die Retikulozytenzählung nicht.

Tabelle 10: Vergleich der Ergebnisse des Parameters der Retikulozytenzählung für XT-2000iV mit der Supravitalfärbung; r = Korrelationskoeffizient; slope = Steigung der Regressionsgleichung; Y-intercept = Nulldurchgang der Regressionsgleichung; Bias = Systematischer Fehler; 95% Limits of agreement; n = Anzahl der Proben

Spezies	Hund; n = 277				
Parameter <b>XT-2000iV</b>	r	slope	Y-intercept	Bias	95% Limits of agreement
RET (%)	0,86	1,31	0,31	0,74	-2,67 – 4,14
RET ( $10^{12}/L$ )	0,85	1,54	0,02	0,17	-1,34 – 1,68

Wie die Tabelle 10 zeigt, kann eine gute Korrelation zwischen der manuellen und der automatisierten Messmethodik festgestellt werden ( $r = 0,86$ , Bias = 0,74).

### 6.3 Linearität und Carry over

In den beiden nächsten Kapiteln werden die Ergebnisse der Linearitätsmessung und des Carry overs von beiden zu evaluierenden Geräten dargestellt.

### 6.3.1 Linearität

Die folgenden Tabelle 11+12 zeigen die Ergebnisse der Linearitätsanalyse unter Angabe des Korrelationskoeffizienten  $r$ , slope (Steigung der Regressionsgleichung) und dem Y-intercept (Nulldurchgang an der Y-Achse).

Tabelle 11: Ergebnisse der Linearitätsbestimmung des pochH-100iV Diff für die Parameter WBC, RBC und HGB bei der Tierart Hund;  $r$  = Korrelationskoeffizient, slope = Steigung, Y-intercept = Y-Nulldurchgang

Parameter <b>poch-100iV Diff</b>	Einheit	Korrelationskoeffizient $r$	slope	Y-intercept
WBC	$10^3/L$	1	0,99	0,49
RBC	$10^6/L$	0,97	0,96	-0,68
HGB	g/dL	0,98	0,75	-0,09

Tabelle 12: Ergebnisse der Linearitätsbestimmung des XT-2000iV für die Parameter WBC, RBC und HGB bei der Tierart Hund;  $r$  = Korrelationskoeffizient, slope = Steigung, Y-intercept = Y-Nulldurchgang

Parameter <b>XT-2000iV</b>	Einheit	Korrelationskoeffizient $r$	slope	Y-intercept
WBC	$10^3/L$	0,99	1,00	0,03
RBC	$10^6/L$	0,97	1,02	-0,78
HGB	g/dL	0,98	0,77	-0,14

Die Linearitätsstudie der beiden Hämatologiesysteme erreicht hohe Korrelationen mit Korrelationskoeffizienten bis 1 für WBC (range 0-80x10<sup>3</sup>/μL), HGB (range 0-22g/dL) und RBC (range 0-13x10<sup>6</sup>/μL). Die Tabellen zeigen, dass die Hämatologiesysteme pochH-100iV Diff und XT-2000iV im Bereich der getesteten Konzentrationen linear messen.

### 6.3.2 Carry over

Zur Überprüfung des Carry over erfolgt siebenmal in Folge nach einer doppelten Messung des 0-Pools eine Messung des 100er-Pools. Die Berechnung der Verschleppung wird durch Subtraktion der Mittelwerte der zweiten 0-Pool-Messung von der ersten 0-Pool-Messung vorgenommen. Die Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse für den Parameter WBC von beiden zu evaluierenden Hämatologiesystemen.

Tabelle 13: Ergebnisse der Verschleppung (%) des pochH-100iV Diff und des XT-2000iV für den Parameter WBC bei der Tierart Hund

Gerät	Parameter (Einheit)	Verschleppung %
<b>pochH-100iV Diff</b>	WBC ( $10^3/\text{L}$ )	0,00
<b>XT-2000iV</b>	WBC ( $10^3/\text{L}$ )	0,03

Wie aus der Tabelle hervorgeht, weist der pochH-100iV Diff für den Parameter WBC keine messbare Verschleppung auf. Das Carry over für den Parameter WBC des XT-2000iV liegt mit einem Wert von 0,03% deutlich unter dem geforderten Grenzbereich von  $\leq 0,25\%$ .

## 6.4 Antikoagulanzenvergleich

Der Einfluss der drei gebräuchlichsten Gerinnungshemmer  $\text{K}_3\text{-EDTA}$ , Li- Heparin und Na- Citrat auf die Messergebnisse der Blutzellzählung und -differenzierung wird für beide zu evaluierenden Geräte (XT-2000iV und pochH-100iV Diff) anhand von 10 Hundebloodproben überprüft. Die Messergebnisse der Parameter WBC, RBC, HGB, HCT, PLT und RET werden aufgrund des entstehenden Verdünnungseffektes (1:10) bei den mit Na- Citrat antikoagulierten Proben mit dem Faktor 1,1 multipliziert. Zur Ermittlung einer Signifikanz werden die Ergebnisse einer einfaktoriellen Varianzanalyse unterzogen. Die Signifikanzen der Blutzellzählung und der Blutzelldifferenzierung für die Hämatologiesysteme pochH-100iV Diff und Sysmex XT-2000iV, sind in den folgenden Tabellen 14 und 15 dargestellt.

Tabelle 14: Signifikanz der Antikoagulanzen K<sub>3</sub>-EDTA, Li- Heparin und Na- Citrat auf die Messergebnisse der Blutzellzählung des pocH-100iV Diff und Sysmex XT-2000iV, n=10

Parameter	Einheit	Signifikanz (p) pocH-100iV Diff	Signifikanz (p) XT-2000iV
WBC	10 <sup>9</sup> /L	n.s	n.s
RBC	10 <sup>12</sup> /L	n.s	n.s
HGB	mmol/L	n.s	n.s
PLT	10 <sup>9</sup> /L	0,0022	n.s
MCV	fl	n.s	0,0004
MCH	fmol	< 0,0001	< 0,0001
MCHC	mmol/L	< 0,0001	< 0,0001
HCT	L/L	< 0,0001	< 0,0001
RET	%	--	n.s.

Wie aus der Tabelle 14 ersichtlich ist, werden für die Parameter WBC, RBC, HGB und MCV des pocH-100iV Diff und für die Parameter WBC, RBC, HGB, PLT und RET des XT2000iV keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Antikoagulanzen festgestellt.

Die folgende Tabelle enthält die Signifikanzen der Blutzelldifferenzierung.

Tabelle 15: Signifikanz der Antikoagulanzen K<sub>3</sub>-EDTA, Li- Heparin und Na- Citrat auf die Messergebnisse der Blutzelldifferenzierung des pocH-100iV Diff und Sysmex XT-2000iV, n=10

Parameter <b>pocH-100iV Diff</b>	Einheit	Signifikanz (p) pocH-100iV Diff	Signifikanz (p) XT-2000iV
Lymphozyten	%	n.s.	n.s.
OTHR	%	0,033	--
Eosinophile Granulozyten	%	<0,0108	n.s.
Neutrophile Granulozyten	%	--	0,034
Monozyten	%	--	n.s.

Für die Parameter der Blutzelldifferenzierung zeigt der XT-2000iV nur bei den neutrophilen Granulozyten einen schwach signifikanten Unterschied zwischen den drei Antikoagulanzen. Der pochH-100iV Diff zeigt schwach signifikante Unterschiede zwischen den drei Antikoagulanzen für die Parameter eosinophile Granulozyten und OTHR (neutrophile Granulozyten und Monozyten).

Zur genaueren Differenzierung der Unterschiede wird paarweise eine Gegenüberstellung der Antikoagulanzen durchgeführt. In die Betrachtung gingen nur die Parameter ein, deren Abweichung in der einfaktoriellen Varianzanalyse als signifikant bewertet wurden. Die statistische Auswertung wird mit Hilfe des t-Tests für verbundene Stichproben unter Anwendung eines vergleichsbezogenen Signifikanzniveaus nach der Bonferroni-Methode durchgeführt und der Mittelwertunterschied sowie die prozentualen Abweichungen berechnet. Welche Wirkung die einzelnen Antikoagulanzen auf diese Parameter hatten, ist in Tabelle 16 für den pochH-100iV Diff und in Tabelle 17 für den XT-2000iV anhand eines Mittelwertvergleichs dargestellt.

Tabelle 16:

Vergleichende Darstellung der Antikoagulanzen K<sub>3</sub>-EDTA, Li- Heparin und Na- Citrat unter Angabe der Signifikanz nach Bonferroni-Methode, Mittelwertunterschied und prozentualer Abweichung am pocH-100iV Diff, Tierart: Hund, n=10

Parameter <b>pocH-100iV Diff</b>	Paarvergleich Antikoagulanz	Mittelwert- unterschied	Prozentuale Abweichung %	Signifikanz p
PLT	EDTA / Heparin	116,8	44,96	< 0,01
	EDTA / Citrat	37,38	14,39	n.s.
	Heparin / Citrat	-79,42	55,54	< 0,05
MCH	EDTA / Heparin	-0,10	0,43	n.s.
	EDTA / Citrat	-2,36	10,19	< 0,001
	Heparin / Citrat	-2,26	9,72	< 0,001
MCHC	EDTA / Heparin	-0,32	0,92	n.s.
	EDTA / Citrat	-3,61	10,32	< 0,001
	Heparin / Citrat	-3,29	9,32	< 0,001
HCT	EDTA / Heparin	-0,29	0,63	n.s.
	EDTA / Citrat	-6,14	13,26	< 0,001
	Heparin / Citrat	-5,85	12,56	< 0,001
Eosinophile G.	EDTA / Heparin	-3,46	-57,28	< 0,05
	EDTA / Citrat	-2,31	-18,25	n.s.
	Heparin / Citrat	1,15	13,79	n.s.
OTHR	EDTA / Heparin	6,31	1,35	n.s.
	EDTA / Citrat	-3,87	5,74	n.s.
	Heparin / Citrat	-10,18	14,27	< 0,01

Am pocH-100iV Diff kann für die Parameter MCH, MCHC und HCT eine prozentuale Abweichung von bis zu 13,26 % zwischen den verschiedenen Antikoagulanzen festgestellt werden. Die Thrombozytenzahl weicht im Vergleich Li-Heparin/Na-Citrat sogar bis zu 55,54% ab.

D.h. für die Messung der Thrombozyten werden in mit Li-Heparin antikoaguliertem Hundeblood 55,54% höhere Werte ermittelt als mit Na-Citrat, während K<sub>3</sub>EDTA gegenüber Li-Heparin mit 14,39% keine statistisch signifikante Abweichung zeigt. Auffällig am Differentialblutbild ist eine starke Abweichung der eosinophilen Granulozytenzahl von -57,28% im K<sub>3</sub>-EDTA/Heparin Vergleich.



Tabelle 17:

Vergleichende Darstellung der Antikoagulanzen K<sub>3</sub>-EDTA, Li- Heparin und Na- Citrat unter Angabe der Signifikanz nach Bonferroni-Methode, Mittelwertunterschied und prozentualer Abweichung am XT-2000iV,  
Tierart: Hund, n=10

Parameter <b>XT-2000iV</b>	Paarvergleich Antikoagulanz	Mittelwert- unterschied	Prozentuale Abweichung %	Signifikanz p
PLT	EDTA / Heparin	38,05	17,02	n.s.
	EDTA / Citrat	33,04	14,78	n.s.
	Heparin / Citrat	-5,02	2,71	n.s.
MCV	EDTA / Heparin	-0,49	0,72	n.s.
	EDTA / Citrat	-6,53	9,65	< 0,01
	Heparin / Citrat	-7,01	10,44	< 0,001
MCH	EDTA / Heparin	0,05	0,21	n.s.
	EDTA / Citrat	-2,22	3,54	< 0,001
	Heparin / Citrat	-2,27	3,78	< 0,001
MCHC	EDTA / Heparin	-0,17	0,49	n.s.
	EDTA / Citrat	-3,38	9,81	< 0,001
	Heparin / Citrat	-3,21	9,27	< 0,001
HCT	EDTA / Heparin	-0,03	0,06	n.s.
	EDTA / Citrat	-5,14	10,47	< 0,001
	Heparin / Citrat	-5,11	10,40	< 0,001
Neutrophile G.	EDTA / Heparin	-0,83	1,65	n.s.
	EDTA / Citrat	-6,20	12,29	n.s.
	Heparin / Citrat	-7,03	12,41	n.s.

Der XT-2000iV zeigt für die Parameter MCV, MCH, MCHC und HCT eine prozentuale Abweichung von bis zu 10,47% zwischen den verschiedenen Antikoagulanzen. Die Thrombozytenzahl weicht anders als beim poCH-100iV Diff im Vergleich Li-Heparin/Na-Citrat nur um 2,71% ab. Im Differentialblutbild zeigt sich eine prozentuale Abweichung bei den neutrophilen Granulozyten von 12,41% im Li-Heparin/Na-Citrat Vergleich.

D.h. für die Messung der neutrophilen Granulozyten werden in mit Li-Heparin antikoaguliertem Hundeblut 12,41% höhere Werte ermittelt als mit Na-Citrat, statistisch gesehen zeigen diese Werte keine signifikante Abweichung.

## 6.5 *Blutalterung und Lagerungstemperatur*

In diesem Abschnitt wird dargestellt, welchen Einfluss die Lagerungstemperatur und die Lagerungsdauer auf die Messergebnisse des XT-2000iV und des pochH-100iV Diff haben. Hierfür werden K<sub>3</sub>-EDTA Blutproben von 10 Hunden verwendet. Gelagert werden die Blutproben bei Raumtemperatur (22°C) und im Kühlschrank (4°C). 72 Stunden dauert die Verlaufsuntersuchung, wobei die Proben 6, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden nach Blutentnahme untersucht werden. Es werden die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse für die wichtigsten Parameter der Blutzellzählung, -differenzierung und die Retikulozytenzählung dargestellt.

### 6.5.1 *Blutzellzählung*

Die folgenden Tabellen 18 und 19 zeigen die Signifikanzen der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit den Einflussfaktoren Temperatur und Zeit für die Parameter der Blutzellzählung beim pochH-100iV Diff und beim XT-2000iV.

Tabelle 18: Einfluss von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer auf die Messergebnisse des pochH-100iV Diff bei Hundeblutproben; n=10; p= Signifikanz

Parameter <b>pochH-100iV Diff</b>	Einfluss der Lagertemperatur	Einfluss der Lagerdauer	Wechselwirkung Lagertemperatur und -dauer
WBC	n.s.	0,0017	n.s.
RBC	n.s.	0,0031	n.s.
HGB	n.s.	n.s.	n.s.
HCT	0,0009	< 0,0001	< 0,0001
MCV	0,0012	< 0,0001	< 0,0001
MCHC	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
MCH	n.s.	0,049	0,035
PLT	n.s.	< 0,0001	0,0007

Tabelle 19: Einfluss von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer auf die Messergebnisse des XT-2000iV bei Hundebutproben; n=10; p= Signifikanz

Parameter <b>XT-2000iV</b>	Einfluss der Lagertemperatur	Einfluss der Lagerdauer	Wechselwirkung Lagertemperatur und -dauer
WBC	n.s.	< 0,0001	< 0,0001
RBC	n.s.	< 0,0001	n.s.
HGB	n.s.	< 0,0001	n.s.
HCT	0,0043	< 0,0001	< 0,0001
MCV	0,0014	< 0,0001	< 0,0001
MCHC	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
MCH	n.s.	< 0,0001	n.s.
PLT	n.s.	< 0,0001	< 0,0001

Wie in Tabelle 18 dargestellt ist, werden sowohl die Leukozytenzählung als auch die Erythrozytenzählung des pochH-100iV Diff signifikant von der Lagerungsdauer beeinflusst. Im Gegensatz dazu hat die Lagerungstemperatur keinen Einfluss auf diese Parameter. Auffällig ist, dass die Lagerungsdauer auf fast alle Parameter (außer HGB) einen größeren Einfluss auf das Messergebnis hat als die Lagerungstemperatur. Hier werden bezüglich der Lagerungsdauer hochsignifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen festgestellt. Ähnliches gilt für den XT-2000iV, hier wird der Einfluss der Lagerungsdauer bei allen Parametern besonders deutlich (Tabelle 19). Es muss beachtet werden, dass bereits geringfügige Abweichungen der Parameter (Temperatur bzw. Zeit) mit geringen Streuungen um den Mittelwert statistisch signifikante Unterschiede der Messergebnisse erzeugen können, die klinisch jedoch keine Bedeutung haben müssen. Der umgekehrte Fall kann bei Parametern mit großen Streuungen um den Mittelwert eintreten und muss bei der Bewertung der Signifikanzen berücksichtigt werden.

Zur Verdeutlichung der Verlaufsuntersuchung soll eine graphische Darstellung einiger ausgewählter Parameter dienen. Es wird der Verlauf der einzelnen Parameter (prozentuale Abweichung vom Ausgangswert) in Abhängigkeit von der Zeit gezeigt.

Zunächst soll der Verlauf der Leukozytenergebnisse des pochH-100iV Diff für die Tierart Hund betrachtet werden, daraufhin folgen die Messergebnisse des XT-2000iV.

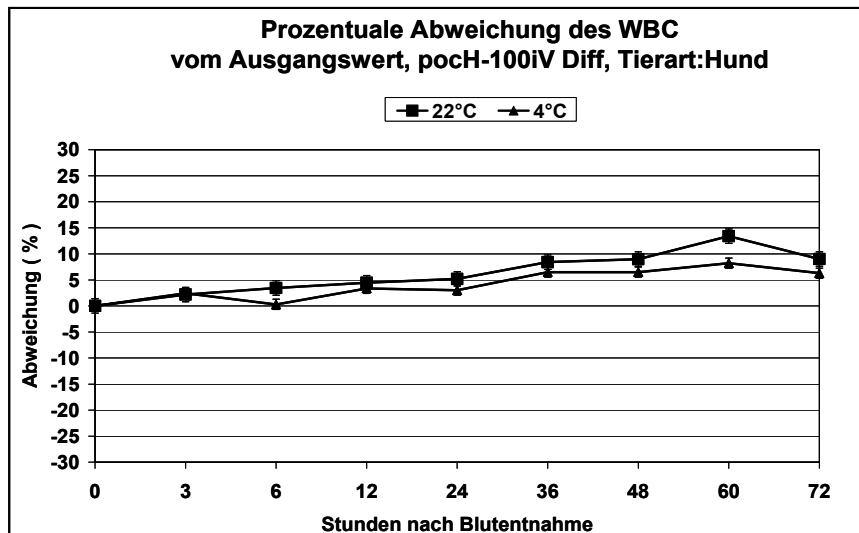


Abbildung 23: Verlauf der prozentualen Abweichung der absoluten Leukozytenzahl vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am pochH-100iV Diff, n=10

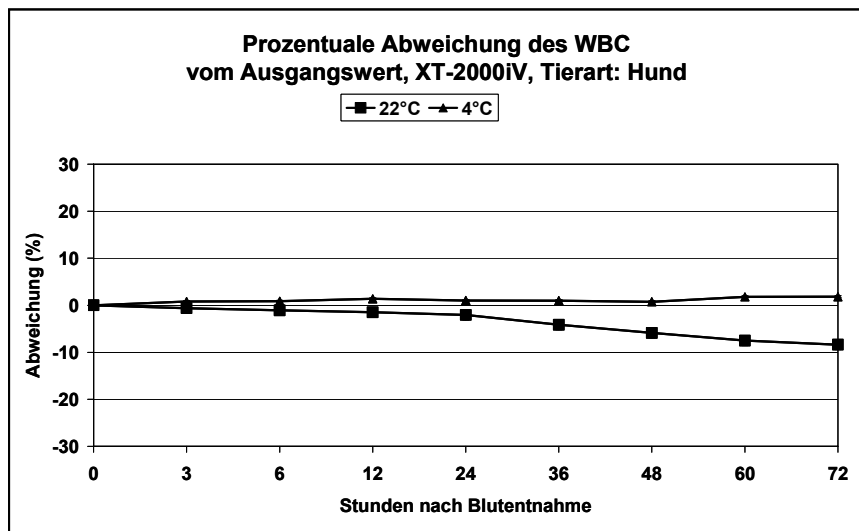


Abbildung 24: Verlauf der prozentualen Abweichung der absoluten Leukozytenzahl vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am XT-2000iV, n=10

Wie in der Abbildung 23 zu erkennen ist, schwankt die Leukozytenzahl der Hunde beim pochH-100iV Diff sowohl bei 4°C als auch bei 22°C geringgradig, wobei die Werte bei 22°C immer höher sind als bei 4°C. Der Einfluß der Lagerungstemperatur ist in diesem Fall mit  $p = 0,0017$  signifikant. Die Leukozytenzahl am XT-2000iV (Abb.:

24) fällt nach einer Lagerungsdauer von 24 Stunden bei Raumtemperatur, bleibt bei Kühlschranktemperatur aber nahezu konstant. Die Wechselwirkung von Lagertemperatur und –dauer ist hier mit  $< 0,0001$  hoch signifikant.

In der Abbildung 25 ist der Verlauf der Hämoglobinkonzentrationsbestimmung der Hunde dargestellt.

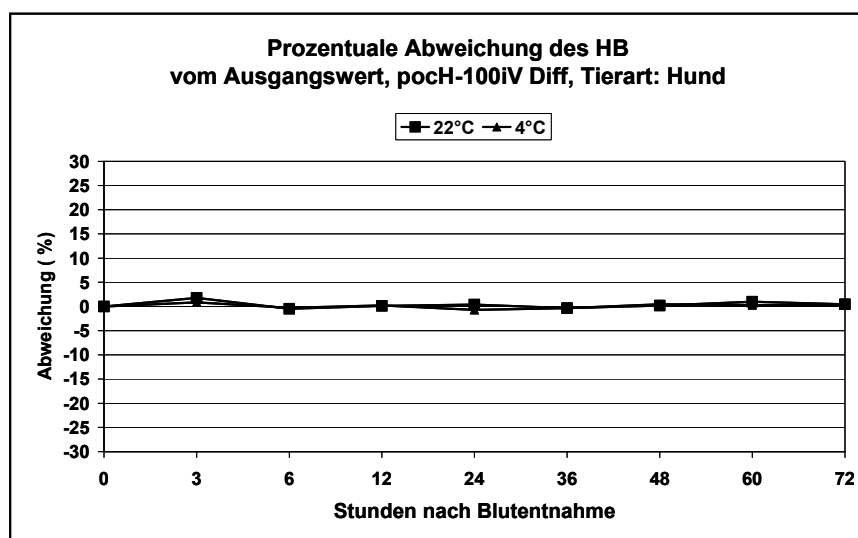


Abbildung 25: Verlauf der prozentualen Abweichung des Hämoglobingehalts HB vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am poch-100iV Diff, n=10

Die Hämoglobinkonzentrationsbestimmung über 72 Stunden ist konstant. Ein ähnliches Ergebnis kann für die Erythrozytenzählung festgestellt werden. Der XT-2000iV liefert einen gleichen Kurvenverlauf. Der Einfluss von Temperatur oder Zeit ist für beide Hämatologiesysteme für diese Parameter nicht signifikant.

In den Abbildungen 26 und 27 sind die Verläufe des Hämatokritwertes und des Mittleren Erythrozytenvolumens MCV der Hunde am pocH-100iV Diff graphisch dargestellt.

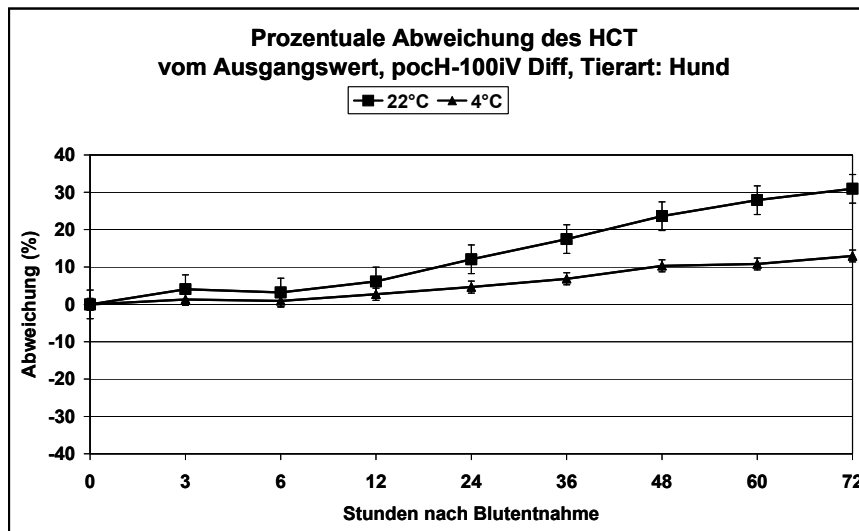


Abbildung 26: Verlauf der prozentualen Abweichung des Hämatokritwertes vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am pocH-100iV Diff, n=10

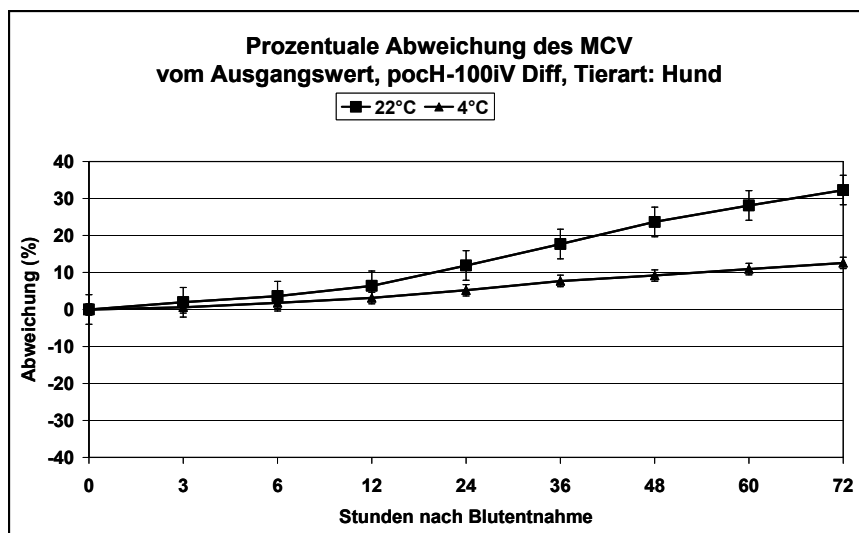


Abbildung 27: Verlauf der prozentualen Abweichung des MCV vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am pocH-100iV Diff, n=10

Wie aus den Abbildungen 26 und 27 ersichtlich ist, steigen sowohl der Hämatokritwert der Hunde als auch das Mittlere Erythrozytenvolumen kontinuierlich mit der Zeit an. Stärker ausgeprägt ist dies bei einer Lagerungstemperatur von 22°C,

wobei gerade nach 24 Stunden die Werte deutlich ansteigen. Da der XT-2000iV die gleichen Ergebnisse liefert wird auf die Darstellung der Grafiken hier verzichtet (Siehe Anhang). Berücksichtigt werden muss für den MCV Anstieg, dass Erythrozyten von Hunden während der Blutalterung Wasser aufnehmen und dadurch anschwellen. Die Einflüsse von Temperatur und Zeit sind für den Hämatokritwert und den MCV hoch signifikant und damit auch nach einer Lagerung von 72 Stunden klinisch bedeutsam.

In der folgenden Abbildung 28 ist die Thrombozytenzahl im Verlauf über 72 Stunden gezeigt.

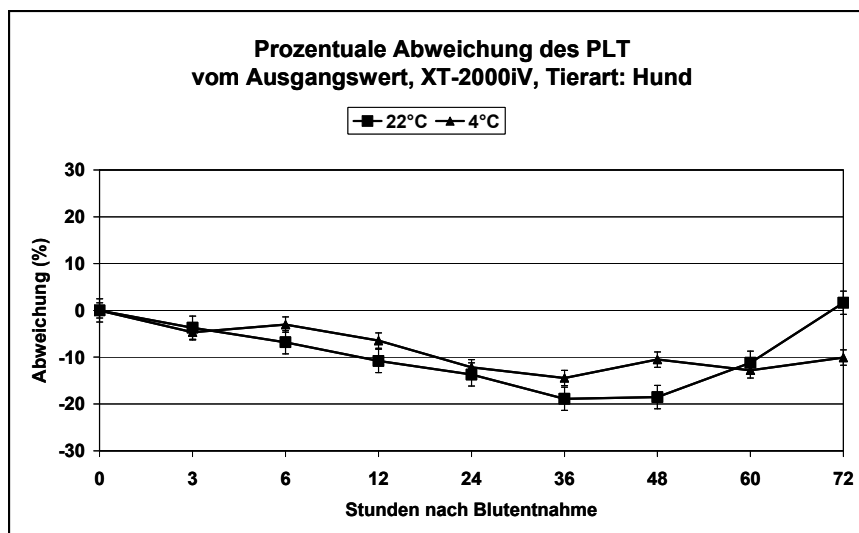


Abbildung 28: Verlauf der prozentualen Abweichung des PLT vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am XT-2000iV, n=10

In der Abbildung ist zu erkennen, dass bereits nach wenigen Stunden die Thrombozytenzahl des XT-2000iV für die Hunde bei beiden Lagerungstemperaturen (4°C und 22°C) stark abfällt. Nach einer Lagerung von 24 Stunden sind die Messwerte ca. 15% niedriger als der Ausgangswert. Die Thrombozytenzahl der im Kühlschrank gelagerten Proben schwankt nach 36 Stunden um ein 10%-ige Abweichung vom Ausgangswert. Die Abweichungen der Thrombozytenzahl vom Ausgangswert ist bei Raumtemperatur etwas stärker ausgeprägt (nach 36h ca. 20% niedriger). Der pochH-100iV Diff zeigt ebenfalls eine Verminderung der Thrombozytenzahl, nach 24 Stunden ist der Wert um ca. 25% niedriger als der Ausgangswert und nach 72 Stunden besteht noch eine Abweichung von ca. 18%.

Der Einfluss der Temperatur ist statistisch für beide Hämatologiesysteme nicht signifikant, der Einfluss der Zeit jedoch ist hoch signifikant. Es ist ersichtlich, dass die Ergebnisse des pocH-100iV Diff und des XT-2000iV bereits nach ungefähr 6 Stunden mit Vorsicht zu interpretieren sind.

Die durchgeführte Verlaufsuntersuchung zeigt, dass die Leukozytenzählung am XT-2000iV und am pocH-100iV Diff bei Raumtemperatur nach 24 Stunden abgeschlossen sein sollte. Beide Geräte sind aber in der Lage verlässliche Ergebnisse (mit nur geringgradigen Abweichungen) zu liefern, wenn die Proben gekühlt gelagert werden (bis zu 72h).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Blutalterung für die Blutzelldifferenzierung beider Hämatologiesysteme dargestellt.



### 6.5.2 Blutzelldifferenzierung

Bei der Blutzelldifferenzierung sind vom pochH-100iV Diff nur neun der zehn untersuchten Hunde in die Beurteilung eingeschlossen, da bei dem Hund Nr. 6 (Balou) das Gerät mehrfach für beide Lagerungstemperaturen kein 3-Zelldifferentialblutbild erstellt hat. Der XT-2000iV erstellt bei allen Hunden ein 5-Zelldifferentialblutbild inklusive der Retikulozytenzahl.

In Tabelle 20 und 21 sind die Signifikanzen der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einflusses „Lagerungstemperatur“ und „Lagerungsdauer“ für die Parameter der Blutzelldifferenzierung des pochH-100iV Diff und des XT-2000iV aufgelistet.

Tabelle 20: Einfluss von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer auf die Messergebnisse des pochH-100iV Diff bei Hundeblutproben; n=9; p= Signifikanz

Parameter <b>pochH-100iV Diff</b>	Einfluss der Lagertemperatur	Einfluss der Lagerdauer	Wechselwirkung Lagertemperatur und -dauer
OTHR	0,003	< 0,0001	< 0,0001
Lymphozyten	0,0005	< 0,0001	< 0,0001
Eosinophile G.	n.s.	< 0,0001	0,041

Tabelle 21: Einfluss von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer auf die Messergebnisse des XT-2000iV bei Hundeblutproben; n=10; p= Signifikanz

Parameter <b>XT-2000iV</b>	Einfluss der Lagertemperatur	Einfluss der Lagerdauer	Wechselwirkung Lagertemperatur und -dauer
Neutrophile G.	n.s.	< 0,0001	< 0,0001
Lymphozyten	n.s.	< 0,0001	< 0,0001
Monozyten	n.s.	< 0,0001	< 0,0001
Eosinophile G.	n.s.	n.s.	n.s.

Aus Tabelle 20 ist zu entnehmen, dass bei allen Parametern des 3-Zell-Differentialblutbildes des pochH-100iV Diff hoch signifikante Unterschiede sowohl durch den Einfluss der Lagerungstemperatur als auch durch den der Lagerungsdauer bestehen. Der Parameter „OTHR“ beinhaltet bei diesem Gerät Zellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten und eventuell vorhandene basophile Granulozyten.

Für den XT-2000iV ist aus der Tabelle 21 zu entnehmen, dass für Monozyten, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten hochsignifikante Unterschiede bezüglich des Einflusses des Faktors „Lagerungsdauer“ und der Wechselwirkung „Lagerungsdauer und -temperatur“ bestehen. Die Messung der eosinophilen Granulozyten wird weder durch die Lagerungstemperatur noch durch die Lagerungsdauer beeinflusst und zeigt somit keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Wie bei der Blutzellzählung erläutert, muss bei der Beurteilung der Signifikanzen berücksichtigt werden, dass geringfügige Abweichungen bei Parametern mit kleinen Streuungen um den Mittelwert signifikante Unterschiede erzeugen können und umgekehrt.

Zunächst wird mit Hilfe der Graphiken der Verlauf der Parameter des Differentialblutbildes des pochH-100iV Diff in Abhängigkeit von der Zeit gezeigt. Im Anschluss werden die Ergebnisse des XT2000iV präsentiert.

Folgende Abbildung 29 zeigt den Verlauf der Lymphozytenanzahl über 72 Stunden bei 4°C und 22°C des pochH-100iV Diff.

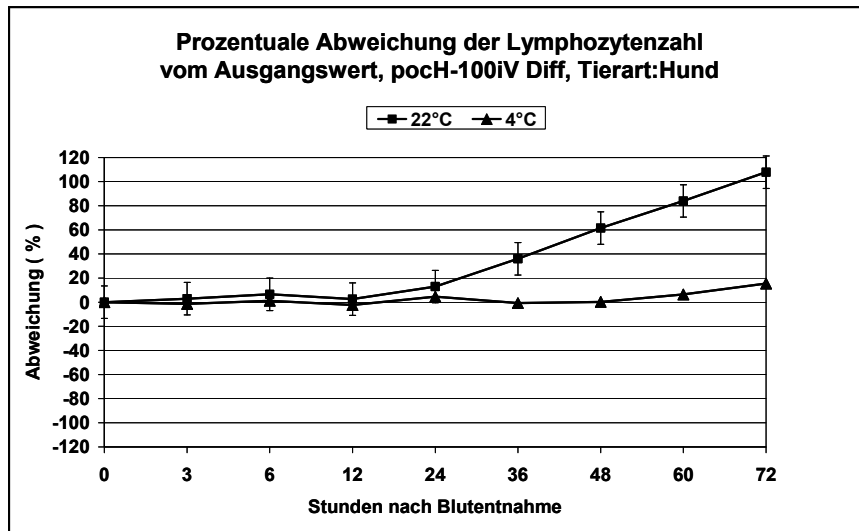


Abbildung 29: Verlauf der prozentualen Abweichung der Lymphozytenzahl vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am poch-100iV Diff, n= 9

Wie aus der Abbildung 29 ersichtlich ist, bleibt die Lymphozytenzahl des poch-100iV Diff bei beiden Lagerungstemperaturen 24 Stunden konstant. Die Ergebnisse nach 72 Stunden bei einer Lagerungstemperatur von 22°C sind mit einer Abweichung von ca. 100% vom Ausgangswert nicht mehr verwertbar. Wird die Probe gekühlt (4°C) bleibt die Lymphozytenzahl weitgehend konstant und steigt erst nach 60 Stunden geringgradig an.

Für den Parameter OTHR des poch-100iV Diff (neutrophile Granulozyten und Monozyten) stellt sich die Verlaufsuntersuchung folgendermaßen dar.

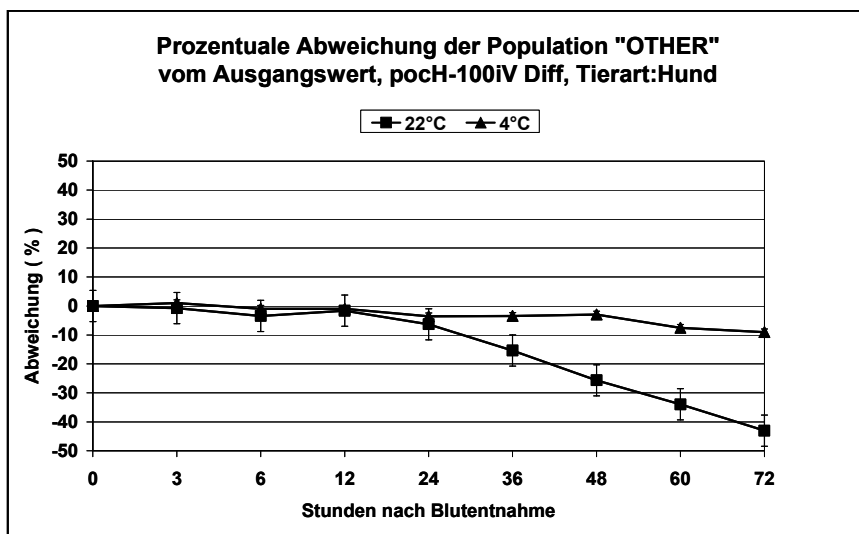


Abbildung 30: Verlauf der prozentualen Abweichung der Population „OTHR“ vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am poch-100iV Diff, n= 9

Wie aus der Abbildung 30 zu erkennen ist, nimmt die Zahl der Population OTHR (neutrophile Granulozyten, Monozyten, eventuell vorhandene basophile Granulozyten) über die Zeit kontinuierlich ab und zwar bei Zimmertemperatur (22°C) stärker als bei Kühlschranklagerung. Es kann festgehalten werden, dass es bei der Differenzierung der Population OTHR und der Lymphozyten zu statistisch hoch signifikanten Veränderungen über die Zeit kommt. Vergleicht man die Graphik der Lymphozyten mit der Graphik für den Parameter OTHR, so lässt sich vermuten, dass Zellen aus dem vorgegebenen Messbereich für die Population OTHR in den Messbereich für die Lymphozyten rutschen. Das führt dazu, dass die Lymphozytenzahlen ansteigen. Da der pochH-100iV Diff unterschiedliche Zellpopulationen in dem Parameter OTHR (Monozyten, neutrophile Granulozyten und eventuell vorhandene basophile Granulozyten) zusammenfasst, lässt sich nicht sagen, welche Zellpopulation in den Messbereich der Lymphozyten rutscht. In der Literatur ist beschrieben, dass bei Verlaufsuntersuchungen mit Rinderblut am ADVIA 120 es die Monozyten sind, die in das Lymphozytencluster hineinrutschen und dann als solche differenziert werden (MORITZ, 2000; siehe hierzu Kapitel 7.1.5).

Abweichungen der Eosinophilenzahlen über die Zeit können in der folgenden Abbildung 31 festgestellt werden.

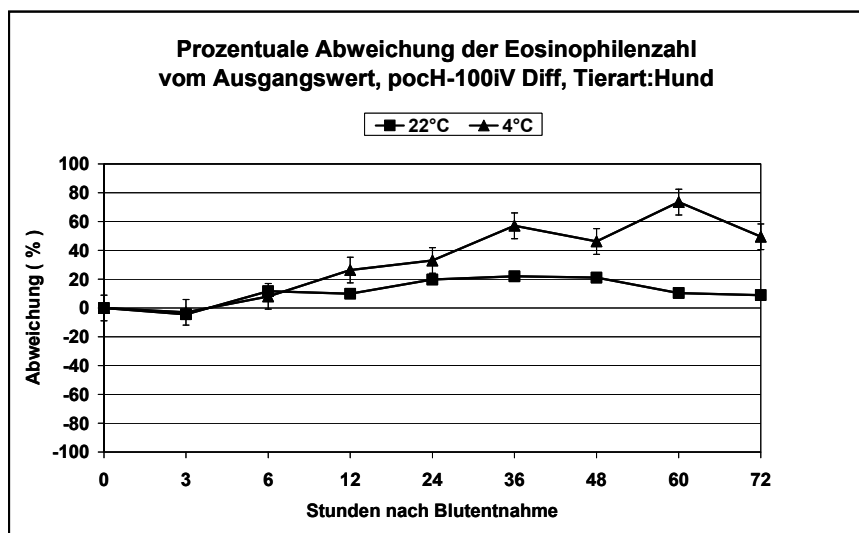


Abbildung 31: Verlauf der prozentualen Abweichung der Eosinophilenzahl vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am pochH-100iV Diff, n= 9

In der Abbildung 31 fallen die Eosinophilenzahlen erst geringgradig ab, weichen dann aber nach 60 Stunden fast 70% vom Ausgangswert ab. Diese Veränderung

zeigt sich bei Kühlschranktemperatur (4°C). Bei Raumtemperatur gelagerte Proben zeigen sich nicht so starke Veränderungen, die Messergebnisse schwanken jedoch. Es lässt sich eine hoch signifikante Veränderung in Abhängigkeit von der Zeit und eine schwach signifikante in Bezug auf die Wechselwirkung der beiden Faktoren (Temperatur und Zeit) feststellen. Auf das Problem der Messung der eosinophilen Granulozyten beim pochH-100iV Diff wird an anderer Stelle eingegangen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei Blutproben von Hunden, die länger als ca. 24 Stunden bei Zimmertemperatur (ca. 36 Stunden bei Kühlschranktemperatur) gelagert werden müssen, das automatische Differenzierungsergebnis des pochH-100iV Diff nicht mehr verwertbar ist. Werden solche gelagerten Blutproben analysiert, sollte zum Zeitpunkt der Blutabnahme ein Blutaussstrich angefertigt werden, um die Ergebnisse zu kontrollieren.

Folgende Abbildung zeigt den Verlauf der Lymphozytenanzahl über 72 Stunden bei 4°C und 22°C des XT-2000iV.

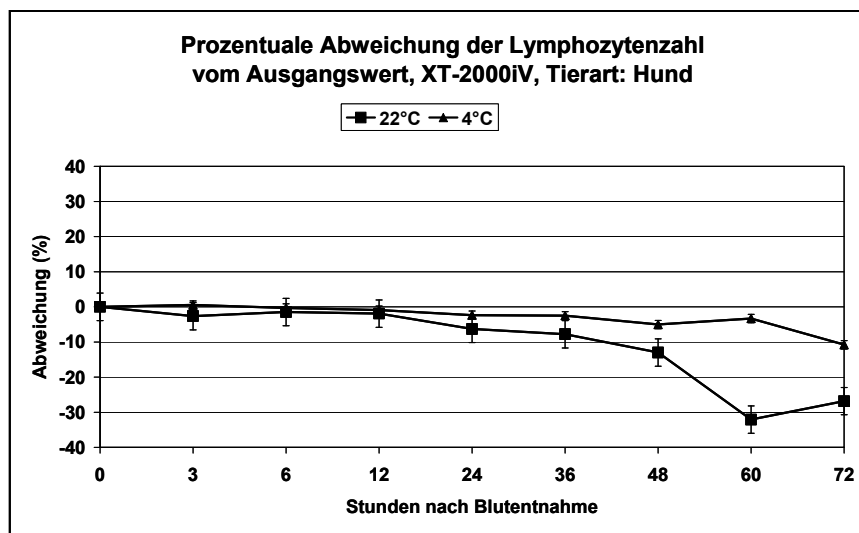


Abbildung 32: Verlauf der prozentualen Abweichung der Lymphozytenzahl vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am XT-2000iV, n= 10

Die Lymphozyten des XT-2000iV bleiben bei 4°C-Lagerung mit einer Abweichung von ca.5% nach 60 Stunden über die Zeit relativ konstant, nach 72 Stunden liegt die

Abweichung bei ca. 10%. Bei Raumtemperatur gelagerte Proben zeigen bereits nach 48 Stunden eine Abweichung von ca. 15% und nach 60 Stunden sogar eine Erniedrigung des Ausgangswertes von über 30%.

In Abbildung 33 ist der zeitliche Verlauf der neutrophilen Granulozyten dargestellt.

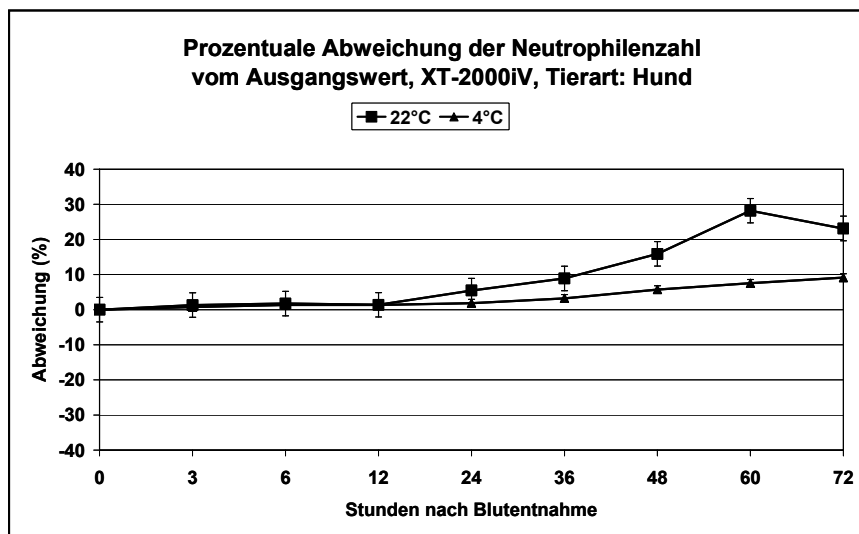


Abbildung 33: Verlauf der prozentualen Abweichung der Neutrophilenzahl vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am XT-2000iV, n= 10

Die Stabilität der Neutrophilenzahl ist abhängig von der Lagerungstemperatur. Die Messwerte der bei Zimmertemperatur aufbewahrten Proben können die ersten 12 – 24 Stunden mit akzeptabler Konstanz gemessen werden. Danach kommt es zu einer Zunahme der Werte um maximal 30% des Ausgangswertes. Die Messwerte der gekühlten Proben bleiben dagegen 60 Stunden mit einer Abweichung von ca. 5% konstant.

In Monozyten verhalten sich in Abhängigkeit von Dauer und Temperatur wie folgt abgebildet.

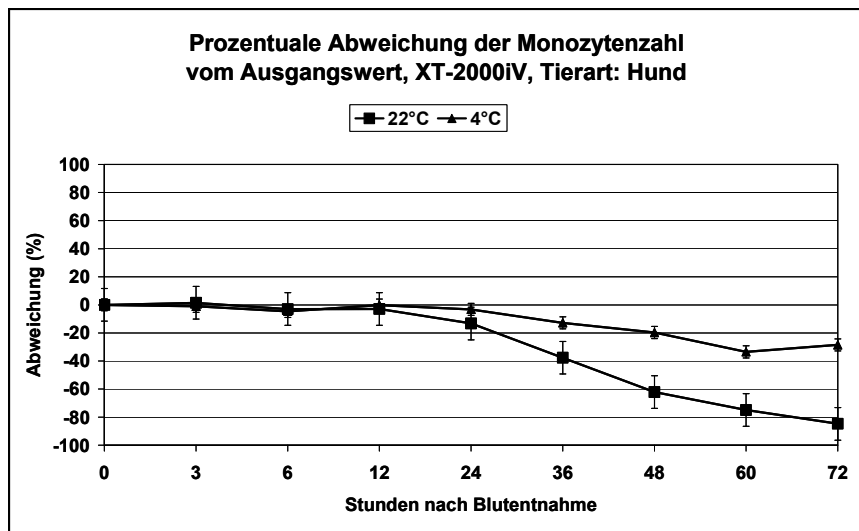


Abbildung 34: Verlauf der prozentualen Abweichung der Monozytenzahl vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am XT-2000iV, n= 10

Die Monozyten zeigen bei 4° C und 22° C nach 12 Stunden einen annähernd gleichen Verlauf. Im Anschluss kommt es zu unterschiedlich starken Erniedrigungen der Monozytenzahl. Die ungekühlten Proben zeigen nach 48 Stunden eine Abweichung von ca. 65% vom Ausgangswert und nach 72 Stunden sogar von ca. 90%. Im Kühlschrank gelagerte Proben zeigen dagegen eine Abweichung von maximal 40% nach 60 Stunden. Vergleicht man die Graphiken der Monozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten fällt auf, dass nach einer Lagerung von 24 Stunden die Mono- und Lymphozytenzahlen abnehmen und die Neutrophilen zunehmen. Wie schon beim pochH-100iV Diff beschrieben, lässt sich vermuten, dass die Monozyten aus ihrem vorgegebenen Messbereich rutschen und vom XT-2000iV als Neutrophile detektiert werden.

Abweichungen der Eosinophilenzahlen über die Zeit können in der folgenden Abbildung 35 festgestellt werden.

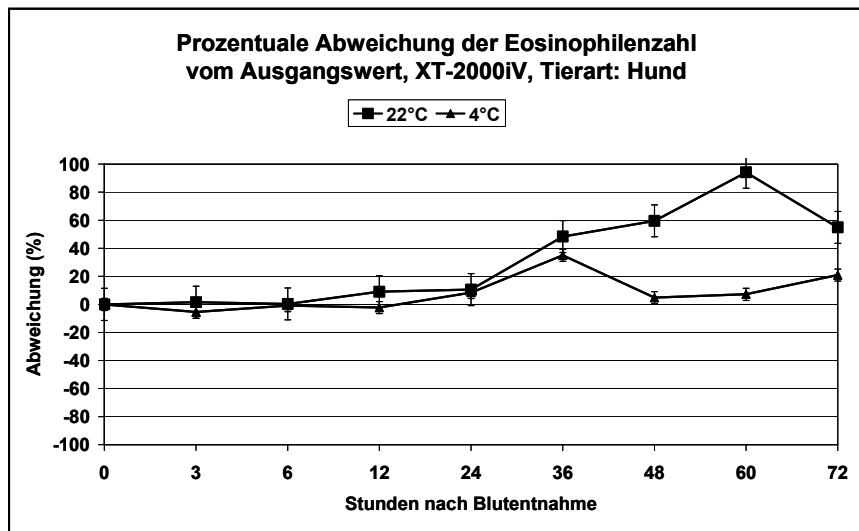


Abbildung 35: Verlauf der prozentualen Abweichung der Eosinophilenzahl vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am XT2000iV, n= 10

Die Stabilität der Eosinophilenzahl ist nach mehr als 24 Stunden stark Temperatur abhängig. 36 Stunden bei Raumtemperatur gelagerte Blutproben zeigen eine Erhöhung der Messergebnisse von ca. 50% und nach 60 Stunden sogar von ca. 90%. Bei im Kühlschrank gelagerten Blutproben liegt die Abweichung nach 36 Stunden bei ca. 35%, fällt dann aber wieder auf eine Erhöhung der Zellzahl von ca. 20% vom Ausgangswert nach 72 Stunden.

Es kann festgehalten werden, dass bei Hundebloodproben die länger als ca. 24 Stunden bei Zimmertemperatur (ca. 36 Stunden bei Kühlschranktemperatur) gelagert werden müssen, die Messergebnisse des Differentialblutbildes am XT2000iV nur noch eingeschränkt verwertbar sind.



### 6.5.3 Retikulozytenzählung

Die folgende Tabelle enthält die Ergebnisse der Blutalterung für die Retikulozytenzählung am XT-2000iV. Der pochH-100iV Diff unterstützt diesen Parameter nicht.

Tabelle 22: Einfluss von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer auf die Messergebnisse des XT-2000iV bei Hundebloodproben; n=10; p= Signifikanz

Parameter <b>XT-2000iV</b>	Einfluss der Lagertemperatur	Einfluss der Lagerdauer	Wechselwirkung Lagertemperatur und -dauer
Retikulozyten %	n.s.	< 0,0001	n.s.

Für die Retikulozytenzählung wird bezüglich der Lagerungsdauer ein hochsignifikanter Unterschied festgestellt. Die Lagerungsdauer und die Wechselwirkung Lagerungsdauer und -temperatur haben keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Messergebnisse. Bei der Interpretation der Signifikanzen ist zu beachten, dass Parameter mit großen Streuungen um den Mittelwert nicht signifikante Unterschiede der Messergebnisse erzeugen können.

Die folgende Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der Retikulozytenzahl dar.

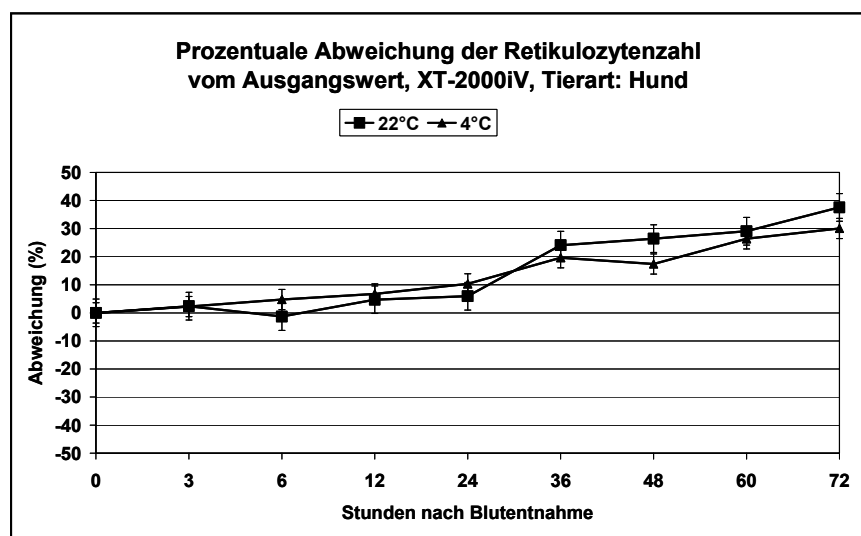


Abbildung 36: Verlauf der prozentualen Abweichung der Retikulozytenzahl vom Ausgangswert bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen am XT-2000iV, n= 10

Wie aus Abbildung 36 ersichtlich ist, zeigen die bei Kühlschranktemperatur und bei Zimmertemperatur gelagerten Blutproben einen ähnlichen Verlauf für 24 Stunden und eine maximale Abweichung von 10% vom Ausgangswert. Bei einer Lagerungsdauer von mehr als 48 Stunden steigen die Messergebnisse bei beiden Temperaturen um maximal 40% vom Ausgangswert an. Hier ist ersichtlich, dass die Messergebnisse der Retikulozyten des XT-2000iV nach einer Lagerung von mehr als 24 Stunden (4° C und 22° C) nicht mehr verwertbar sind.

## 7 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

### 7.1 *Evaluierung von poch-100iV Diff und XT-2000iV*

Werden neue Hämatologiesysteme oder bereits eingeführte Geräte mit einer neuen Software evaluiert, dient dies der Qualitätssicherung. Zum Zeitpunkt der Markteinführung soll sichergestellt sein, dass die Systeme auch die Leistungen erbringen, die der Hersteller angibt. Die Evaluation der Hämatologiesysteme Sysmex poch-100iV Diff und XT-2000iV erfolgte in Anlehnung an die veröffentlichten Richtlinien zur Evaluierung von Blutanalysegeräten (ENGLAND et al., 1994). Diese Richtlinien basieren auf dem vom ICSH (International Council for Standardization in Haematology) erstellten Protokoll zur Evaluierung von automatischen Blutzellanalysegeräten (1984) und beziehen sich auch auf die automatische Differenzierung von Leukozyten und Retikulozyten.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Evaluierung in mehreren Schritten für die Tierart Hund, eine andere Dissertation der Arbeitsgruppe befasst sich gleichzeitig mit der Tierart Katze.

#### 7.1.1 *Präzision*

Mit der Präzision wird die Messgenauigkeit eines Gerätes wiedergegeben. Ihre Überprüfung ist notwendig, um die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen darzustellen. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Präzision innerhalb der Serie von beiden Hämatologiesystemen für Blutzellzählung, -differenzierung und Retikulozytenzählung (nur vom XT-2000iV) abgehandelt. DÖRNER et al. (1993) erwarten von einem modernen Hämatologiesystem in der Humanmedizin für alle Zellen Variationskoeffizienten  $\leq 3 \%$ .

In der Literatur wurden für die automatische Zellzählung in Tierblut mittels Impedanzmethode beispielsweise folgende Variationskoeffizienten (CV) ermittelt: CV = 1,7% - 11,27% (WBC) sowie 0,9% - 7,67% (RBC) und 0,65% – 10,95% (PLT) (STEWART und STEEL, 1974; LUMSDEN et al., 1975; SPÄTH und WEBER, 1992; MOHR, 1995).

#### **7.1.1.1 Parameter der Blutzellzählung**

In vorliegender Arbeit wurde der ADVIA 2120 als Referenzgerät für die Blutzellzählung eingesetzt. In der Literatur sind keine Ergebnisse einer Evaluierung zu finden. Da es sich bei diesem Gerät aber um den Nachfolger des ADVIA 120 handelt und die gleiche Messtechnik genutzt wird, werden diese Ergebnisse aus der Literatur herangezogen. So erzielte FICKENSCHER 2001 bei der Softwareadaptation zur Evaluierung des ADVIA 120 für die Tierart Hund CV-Werte zwischen 0,41% (MCV) und 4,21% (WBC), für die Thrombozytenzahl liegt der CV-Wert bei 3,47%. Die Ergebnisse liegen im Vergleich zu den Literaturangaben in einem sehr guten Bereich. MORITZ verglich 2000 die Präzisionsdaten des ADVIA 120 für mehrere Tierarten mit den Literaturangaben und beurteilt die Präzisionsresultate der Blutzellzählung für den ADVIA 120 als hervorragend. Beispielsweise werden bei der Präzision des ADVIA 120 innerhalb der Serie für die Parameter der Blutzellzählung CV-Werte von 0,9% (RBC) bis 1,4% (WBC) für die Tierart Hund angegeben. Exzellente Präzision erreichte der ADVIA 120 bei der Tierart Hund für die Thrombozytenzählung (CV = 2,9%). (MORITZ, 2000). In einer Studie von LANGFORDT et al., 2003 wurden am XT-2000i mit Humanblut folgende Variationskoeffizienten ermittelt: CV = 1,6% (WBC), 0,6% (RBC), 0,7% (HGB), 0,3% (MCV), 0,7% (HCT) und CV = 0,8% (PLT) (LANGFORD et al.; 2003).

Stellt man nun die Ergebnisse der Präzision der Hämatologiesysteme pocH-100iV Diff und XT-2000iV innerhalb der Serie (siehe Tabelle 1 bis 4) den Literaturangaben gegenüber, kann festgehalten werden, dass die Variationskoeffizienten beider Hämatologiesysteme für die Leukozytenzählung (WBC) CV = 1,2% deutlich an der unteren Grenze der bisher aufgeführten Werten liegen. Die Präzision der Erythrozytenzählung zeigt mit CV-Werten von 0,4% für den XT-2000iV und mit 0,9% für den pocH-100iV Diff sehr gute Resultate. Somit wird die von DÖRNER (1993) geforderte Grenze von CV < 3 % für die Tierart Hund sowohl vom pocH-100iV Diff

als auch vom XT-2000iV eingehalten. Die Präzisionsergebnisse der Thrombozytenzählung (PLT) erreichen ebenfalls gute CV-Werte von 4,9% für den pocH-100iV Diff und 5,4% für den XT-2000iV.

#### **7.1.1.2 Parameter der Blutzelldifferenzierung**

Als Richtlinie für die zu erwartende Präzision der manuellen Differenzierung dienen die folgenden von BUTTARELLO (1992) ermittelten Resultate eines 800- Zell-Differenzialblutbildes beim Menschen: neutrophile Granulozyten CV = 5,67%, Lymphozyten CV = 8,64%, eosinophile Granulozyten CV = 39,31%, Monozyten CV = 25,90% und basophile Granulozyten CV = 96,29% (BUTARELLO et al., 1992).

Bei der Interpretation der Resultate muß daran gedacht werden, dass bei manueller Differenzierung zwischen 100 und 800 Zellen differenziert werden, automatische Hämatologiesysteme differenzieren dagegen zwischen 5000 und 15000 Zellen. Dieser Faktor aber auch das Vorkommen der jeweiligen Zellart im peripheren Blut nimmt Einfluss auf die statistische Genauigkeit, mit der Zahlenwerte im Differenzialblutbild erfasst werden. Schwankungen bei an sich schon niedriger Zellzahl fallen sehr viel mehr ins Gewicht (RÜMKE, 1960). Die Variationskoeffizienten der automatischen Zelldifferenzierung sollten somit besser sein als das manuelle Ergebnis.

Die in eigener Untersuchung ermittelten CV-Werte der Präzision innerhalb der Serie (25fach-Messung) bei der automatischen Zelldifferenzierung mit dem pocH-100iV Diff und dem XT-2000iV sind aus Gründen der besseren Übersicht tabellarisch aufgeführt und den Ergebnissen von FICKENSCHER, 2001 für die Tierart Hund gegenüber gestellt. Die Ergebnisse von MORITZ (2000) sind ähnlich und daher nicht mit aufgeführt.

Tabelle 23: Vergleich der Variationskoeffizienten CV der relativen Zahlen des Differenzialblutbildes bei der Tierart Hund von pocH-100iV Diff, XT-2000iV und ADVIA120

	Eigene Untersuchungen Präzision innerhalb der Serie		FICKENSCHER (2001) ADVIA120 CV %
	<b>pocH-100iV Diff</b>	<b>XT-2000iV</b>	
Neutrophile G./ OTHER	1,2	1,2	3,2
Lymphozyten	2,2	1,9	30,7
Monozyten	--	5,2	5,7
Eosinophile G.	10,72	3,4	24,2

Die Ergebnisse des ADVIA120 werden in der Literatur für die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und Monozyten werden als sehr gut gewertet. Der CV-Wert von 30,7% für die Lymphozyten wird als Ausreißer gesehen (FICKENSCHER, 2001). MORITZ erzielt bei seinen Untersuchungen mit dem ADVIA 120 für die Tierart Hund allerdings auch einen CV-Wert von 30,5% für die Lymphozyten und wertet dies als ein schlechtes Ergebnis (MORITZ, 2000). Die Ergebnisse des pocH-100iV Diff für die Lymphozyten (CV = 2,2%) und den Parameter „OTHR“, der hauptsächlich neutrophile Granulozyten beinhaltet, sind im Vergleich zu den Literaturangaben als sehr gut und der CV-Wert der Eosinophilen Granulozyten als gut zu bezeichnen. Der XT-2000iV zeigt wie in der Tabelle ersichtlich eine sehr gute Präzision innerhalb der Serie für das gesamte Differentialblutbild. Besonders erfreulich ist das Ergebnis der eosinophilen Granulozyten mit einem Variationskoeffizienten von 3,4%, der deutlich unter den in der Literatur angegebenen Werten liegt. Die Ergebnisse des XT-2000iV gleichen denen in einer Studie von LANGFORD et al. von 2003. Hier wurden CV-Werte am XT-2000i von 1,6% für Neutrophile Granulozyten, 1,9% für Lymphozyten und von 3,5% für Monozyten mit Humanblut erreicht (LANGFORD et al., 2003).

#### 7.1.1.3 Retikulozytenzählung

In veterinärmedizinischen Labors gilt die mikroskopische Auszählung von 1000 Erythrozyten nach Supravitalfärbung als Standardtechnik der Retikulozytenzählung (WEISER, 1981; REAGAN et al., 1992; PERKINS et al., 1995). Fehlermöglichkeiten

bei dieser Methode sind zum Beispiel ungleichmäßige Ausstriche, mathematische Probleme bei niedriger Anzahl und Interpretationsfehler durch den Untersucher. Je reifer der Retikulozyt und je weniger anfärbbares Material vorhanden, desto schwerer ist er zu identifizieren (ABBOTT und MCGRATH, 1991; EVANS und FAGG, 1994). Die Retikulozyten des Hundes sind fast immer vom aggregierten Typ (Verklumpung der RNA-haltigen Ribosomen und Polyribosomen zu Aggregaten), so dass diese nach Anfärbung einfacher zu zählen sind. Jedoch sind die genannten Fehlermöglichkeiten bezüglich der manuellen Methode und auch Zeitgründe die Ursache dafür, heutzutage die automatisierte Zählung anzustreben. Die Durchflusszytometrie ist auch bei der Retikulozytenzählung mittlerweile etabliert und somit ist die automatisierte Zählung 10mal präziser als die manuelle Methode (D'ONOFRIO et al., 1997). Im Humanlabor liegt der Variationskoeffizient für die automatisierte Retikulozytenzählung  $< 5\%$ , im Gegensatz dazu liegt er für die manuelle Methode  $> 25\%$  (PERKINS et al., 1995). FICKENSCHER erzielt 2001 am ADVIA120 für die Tierart Hund für die relative Retikulozytenzahl einen guten CV-Wert von  $10,38 - 14,37\%$  und für die absolute Zahl ebenfalls einen guten CV-Wert von  $9,95 - 11,48\%$  (FICKENSCHER, 2001).

Das College of American Pathology empfiehlt in seinem Reticulocyte Project für die automatische Retikulozytenzählung einen Variationskoeffizienten von  $< 15\%$  (SAVAGE et al., 1985). LANGFORD et al. erzielte 2003 mit Humanblut am XT-2000i für die absolute Retikulozytenzahl einen Variationskoeffizienten von  $4,9\%$ , der als exzellent bewertet wird (LANGFORD et al.; 2003).

In den eigenen Untersuchungen konnte, wie in Tabelle 5 ersichtlich ist, für die relative Retikulozytenzahl des XT-2000iV ein CV-Wert von  $7,7\%$  und für die absolute Zahl ein CV-Wert von  $7,8\%$  für die Tierart Hund errechnet werden. Im Vergleich mit den Literaturangaben für Humanblut und dem ADVIA120 für die Tierart Hund stellt dies ein sehr gutes Ergebnis dar.

### **7.1.2 Methodenvergleich**

Der Vergleich der Messergebnisse von Blutproben mit verschiedenen Geräten und Methoden dient der Einschätzung der Richtigkeit von Resultaten eines zu evaluierenden Gerätes (VON RÜCKER et al., 1994). Als Referenzgerät diente in der vorliegenden Arbeit das Hämatologiesystem ADVIA 2120, die Hämatokritzentrifuge sowie manuell differenzierte PAN- und supravitalgefärbte Blutausstriche.

Bei der statistischen Auswertung wurde neben der Regressions- und Korrelationsanalyse zusätzlich die von BLAND und ALTMAN (1986) beschriebene Darstellung gewählt (siehe Kapitel 4.2). Das Ergebnis dieser graphischen Methode lässt sofort erkennen, wie weit sich die Werte voneinander unterscheiden und ob diese Differenzen für die klinische Interpretation von Bedeutung sind (BLAND und ALTMAN, 1986). Bedeutung erlangen diese Differenzen immer dann, wenn durch sie die klinische Diagnose geändert werden würde. Wenn beispielsweise das Gerät die Lymphozyten einer Blutprobe noch im Referenzbereich misst, das Ergebnis der Referenzmethode aber über diesem Bereich läge, hätte der Untersucher den Konflikt zu beurteilen, ob es sich um eine Lymphozytose handelt oder nicht. Somit entsteht eine klinische Relevanz der Differenz (NEUERER, 2005).

#### **7.1.2.1 Parameter der Blutzellzählung**

Die Auswertung der Korrelationskoeffizienten der Parameter WBC, RBC und HCT des Vergleichs pocH-100iV Diff mit dem ADVIA 2120 ergibt mit  $r \geq 0,98$  sehr gute Resultate (siehe Tab.6). Die Erythrozytenindizes zeigen mit  $r = 0,63$  (MCH) und  $r = 0,33$  (MCHC) fast keine Übereinstimmung der Messergebnisse. Letzteres erklärt sich unter anderem dadurch, dass die Zahlenwerte in einem ganz engen Bereich liegen und dadurch bereits schlechtere Korrelationen zu erwarten sind. Zu beachten ist hier die Tatsache, dass das HGB des ADVIA 2120 zu allen Geräten (auch zum ADVIA 120) eine große Abweichung zeigt, diese Problematik wird später in diesem Kapitel erläutert (siehe Tabelle 26).



Erfreulich ist dagegen eine gute Korrelation zwischen den beiden Geräten bezüglich der Thrombozytenzahl ( $r = 0,93$ ) und dem MCV ( $r = 0,89$ ). Die eigenen Ergebnisse werden in folgender Tabelle den Resultaten aus der Literatur gegenübergestellt. Es handelt sich um eine Studie von BECKER (2007), hier wurden verschiedene Hämatologiesysteme mit dem ADVIA 120, dem Vorgängermodell mit gleicher Messtechnologie (Ausnahme bei HGB: ADVIA 2120 zyanidfreie Methode, ADVIA 120 Zyanmethode) des ADVIA 2120, verglichen.

Tabelle 24: Vergleich der Korrelationskoeffizienten und Bias für die Parameter WBC, RBC, HGB, MCV und PLT von verschiedenen In-Haus-Geräten aus der Studie BECKER, 2007 für die Tierart Hund mit den eigenen Untersuchungen

Geräte	Prinzip *	Korrelationskoeffizient (r) und Bias				
		WBC	RBC	HGB	MCV	PLT
pocH-100iV Diff vs ADVIA2120	1	$r=0,99$ Bias=0,56	$r=0,98$ Bias=0,04	$r=0,75$ Bias=-1,13	$r=0,89$ Bias=-0,55	$r=0,93$ Bias=-36,50
Scil VetABC vs ADVIA120	1	$r=0,99$ Bias=1,11	$r=0,99$ Bias=0,22	$r=0,99$ Bias=0,47	$r=0,92$ Bias=-3,33	$r=0,89$ Bias=-47,93
VetScan HMT vs ADVIA120	1	$r=0,99$ Bias=1,21	$r=0,99$ Bias=-0,04	$r=0,99$ Bias=0,33	$r=0,85$ Bias=7,76	$r=0,80$ Bias=-8,02
ForCyte vs ADVIA120	2	$r=0,99$ Bias=0,81	$r=0,97$ Bias=0,41	$r=0,98$ Bias=-0,21	$r=0,88$ Bias=-4,29	$r=0,79$ Bias=6,38

\* *Legende Messprinzipen:*

1 = Impedanzmethode, 3-Zell-Diff, 2 = Laser- und Impedanzmethode, 5-Zell-Diff (Impedanzmethode bei Zellzählung)

Für den Vergleich der Korrelationskoeffizienten und Bias mit dem pocH-100iV Diff wurden aus der Studie von BECKER (2007) Hämatologiesysteme herangezogen, welche die gleichen Messprinzipien nutzen und in ihrer Art wie auch der pocH-100iV Diff als In-Haus-Geräte bezeichnet werden. Wie man der Tabelle 24 entnehmen kann, liegen die Ergebnisse aller In-Haus-Geräte nahe beieinander. Der pocH-100iV Diff fällt durch sein relativ schwaches Ergebnis bei der Hämoglobinbestimmung auf. Dies wird im Anschluss zusammen mit den Ergebnissen des XT-2000iV besprochen.

Die anderen In-Haus-Geräte zeigen hier sehr gute Übereinstimmungen mit dem ADVIA 120 als Referenzgerät. Erfreulich dagegen zeigt sich das Gerät in der Übereinstimmung der Messergebnisse bei der Thrombozytenzahl.

Für den pocH-100iV Diff lässt sich festhalten, dass bei den Parametern Leukozyten, Erythrozyten und Hämoglobin die positive mittlere Abweichung (Bias) anzeigt, dass das Gerät eher höhere Werte misst als das Referenzgerät. Weiterhin misst der pocH-100iV Diff beim Hämatokrit und der Thrombozytenzahl eher niedrigere Werte als die Referenzmethode, was durch die negative mittlere Differenz zum Ausdruck kommt. Insgesamt waren die Differenzen aber so gering, dass diesem allgemeinen Trend keine klinische Signifikanz zugesprochen werden kann und der pocH-100iV Diff im Vergleich zu anderen In-Haus-Geräten bei der Zellzählung für die Tierart Hund gut bis sehr gut abschneidet.

Der XT-2000iV stellt im Vergleich zum poch-100iV Diff kein In-Haus-Gerät dar und wird daher beim Vergleich der Messergebnisse aus dem Methodenvergleich mit Angaben aus der Literatur über den Cell-Dyn 3500 und dem ADVIA 120 bewertet. LANGFORD et al. (2003) führten in den USA eine Studie mit dem XT-2000i mit Humanblut durch und erzielten im Methodenvergleich mit dem XE-2100 der Firma Sysmex sehr gute Ergebnisse. Die eigenen Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle den Resultaten aus der Literatur gegenübergestellt.

Tabelle 25: Vergleich der Korrelationskoeffizienten und Bias für die Parameter WBC, RBC, HGB, MCV und PLT von verschiedenen Hämatologiesystemen aus der Studie BECKER (2007), FICKENSCHER (2001) für die Tierart Hund und aus der Studie LANGFORD et al. (2003, Humanblut) mit den eigenen Untersuchungen

Geräte	Prinzip *	Korrelationskoeffizient (r) und Bias				
		WBC	RBC	HGB	MCV	PLT
XT-2000iV vs ADVIA2120	1	r=1,00 Bias=0,01	r=0,98 Bias=0,22	r=0,83 Bias=-1,05	r=0,91 Bias=2,04	r=0,98 Bias=-56,56
Cell-Dyn 3500 vs ADVIA120	2	r=0,994 Bias=-0,58	r=0,985 Bias=0,00	r=0,995 Bias=-0,30	r=0,938 Bias=1,87	r=0,82 Bias=-31,65
ADVIA120 vs H*1	3	r=0,999 Bias= --	r=0,995 Bias= --	r=0,999 Bias= --	r=0,892 Bias= --	r=0,993 Bias= --
XT-2000i vs XE-2100	4 (Human- blut)	r=1,00 Bias= --	r=1,00 Bias= --	r=1,00 Bias= --	r=0,98 Bias= --	r=0,98 Bias= --

\* *Legende Messprinzipen:*

1 = Fluoreszenz-Durchflussszytometrie und Impedanzmethode, 5-Zell-Diff (inklusive Retikulozyten), 2 = Durchflussszytometrie und Laserstreulichtmesssystem (mit Impedanzmethode), 5-Zell-Diff (ohne Retikulozyten) 3 = Durchflussszytometrie, Laserstreulichtmessmethode, Peroxidaseaktivitätsbestimmung, 5-Zell-Diff (inklusive Retikulozyten), 4= Fluoreszenz-Durchflussszytometrie und Impedanzmethode, 5-Zell-Diff (inklusive Retikulozyten)

Insgesamt lässt sich für den XT-2000iV aus den eigenen Untersuchungen festhalten, dass hervorragende Übereinstimmungen mit den Messergebnissen des ADVIA 2120 für die Parameter WBC, RBC, HCT und PLT erzielt wurden.

Tabelle 26: Vergleich der Korrelationskoeffizienten, slope, Y-intercept und Bias für den Parameter Hämoglobin von XT-2000iV, ADVIA2120 und ADVIA120 für die Tierart Hund.

Hämoglobin-Messung	r	slope	Y-intercept	Bias
XT-2000iV vs. ADVIA2120	0,83	0,84	-0,03	-1,05
XT-2000iV vs. ADVIA120	0,96	1,05	-0,35	0,13
pocH-100iV Diff vs. ADVIA2120	0,75	0,78	0,45	-1,13
pocH-100iV Diff vs. ADVIA120	0,94	0,98	0,08	-0,11

Tabelle 26 zeigt die Hämoglobinmessung im Einzelnen. Bei beiden Geräten (pocH-100iV Diff und XT-2000iV) fällt eine niedrige Steigung (slope = 0,78 bzw. 0,84) auf. Ein optimaler Wert liegt nahezu bei 1, unter 1 bedeutet, dass beide Hämatologiesysteme den wahren Wert unterschätzen. Die Literatur zeigt eine Studie von BAUER et al., 2008, in der der ADVIA120 mit dem ADVIA2120, hinsichtlich der unterschiedlichen Messmethoden (Zyanmethämoglobinmethode vs. Zyanfreie Hämoglobinmethode) verglichen wird. Die Resultate ergeben dort ebenfalls einen proportionalen Fehler.

Aufgrund dessen werden die eigenen Resultate beider Geräte mit denen des ADVIA120 verglichen und ergeben mit Korrelationskoeffizienten von 0,94 bzw. 0,96 und einem slope von 0,98 bzw. 1,05 eine sehr gute Übereinstimmung mit dem ADVIA120.

Stellt man diese Resultate den Angaben aus der Literatur gegenüber, liegen die Korrelationskoeffizienten sehr nahe beieinander und alle Geräte erzielen sehr gute Resultate in der Blutzellzählung für die Tierart Hund. Wie aus der Tabelle 25 ersichtlich erzielte der XT-2000iV mit der Humanblutsoftware hervorragende Ergebnisse ( $r \geq 0,98$ ), mit denen sich das gleiche Gerät aus den eigenen Untersuchungen mit der Software für die Tierart Hund durchaus messen kann.

#### **7.1.2.2 Parameter der Blutzelldifferenzierung mit Fallbeispielen**

Im Methodenvergleich zur Blutzelldifferenzierung diene die manuelle Differenzierung von panoptisch gefärbten Blutausstrichen als Referenzmethode. Von den 122 Hundeblutproben, die in den Methodenvergleich für den pocH-100iV Diff eingeflossen sind konnten nur 107 zur Auswertung der Differentialblutbilder genutzt werden, da der pocH-100iV Diff bei 15 Hundeblutproben kein Differentialblutbild erstellt hat (siehe Kap.6.2.2). Als In-Haus-Gerät erstellt dieses Hämatologiegerät ein 3-Zell-Differentialblutbild bestehend aus Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und „OTHER“ (Abkürzung „OTHR“). Die Bezeichnung „OTHR“ steht hauptsächlich für die neutrophilen Granulozyten, es zählen aber auch Monozyten und eventuell vorhandene basophile Granulozyten dazu. Zunächst werden die Ergebnisse für den pocH-100iV Diff des Methodenvergleichs tabellarisch den Resultaten der Literatur gegenübergestellt.

Tabelle 27: Vergleich der Korrelationskoeffizienten und Bias für die Parameter des Differentialblutbildes von verschiedenen Hämatologiesystemen aus der Studie FICKENSCHER (2001), NEUERER (2005) und BECKER (2007) für die Tierart Hund mit den eigenen Untersuchungen

Parameter (%)	pocH-100iV Diff vs manuell	ADVIA120 vs manuell	Cell-Dyn 3500 vs manuell	Scil VetABC vs manuell	VetScan HMT vs manuell
OTHER	r=0,79 Bias=2,02				
Neutrophile Granulozyten		r=0,970 Bias= --	r=0,974 Bias= --	r=0,974 Bias=2,14	r=0,987 Bias=0,22
Lymphozyten	r=0,85 Bias=0,44	r=0,799 Bias= --	r=0,701 Bias= --	r=0,676 Bias=-1,04	r=0,451 Bias=0,87
Monozyten		r=0,436 Bias= --	r=0,268 Bias= --	r=0,183 Bias=-0,92	r=0,79 Bias=-0,79
Eosinophile Granulozyten	r=0,22 Bias=3,48	r=0,785 Bias= --	r=0,835 Bias= --		

Bei der Beurteilung der Korrelationskoeffizienten des pocH-100iV Diff im Vergleich mit den angegebenen Geräten aus der Literatur muss beachtet werden, dass nur der VetABC und der VetScan als In-Haus-Geräte die gleiche Messmethode (Impedanzprinzip) zur Differenzierung der Leukozyten nutzen. Die Leukozytendifferenzierung des Cell-Dyn 3500 ist Laser gestützt und der ADVIA120 nutzt die Peroxidaseaktivität der einzelnen Zellpopulationen (und die Laser gestützte Analyse), zudem erstellen beide Geräte ein 5-Zell-Differenzialblutbild (inklusive der Retikulozyten).

Für die Parameter der Blutzelldifferenzierung kann gesagt werden, dass die Korrelationen des pocH-100iV Diff mit dem manuellen Differentialblutbild vergleichend mit den Literaturangaben in einem ausreichenden Bereich liegen. Akzeptabel ist der Korrelationskoeffizient der Lymphozyten mit 0,85. Wichtig für den Anwender zu wissen ist jedoch, ob das Gerät in der Lage ist, Blutproben mit deutlichen hämatologischen Veränderungen zu erkennen. Als Beispiel ist an dieser Stelle das Lymphom Grad V zu nennen, bei dem im Blutaussstrich des Patienten deutlich Lymphoblasten zu erkennen sind. Im Idealfall würde man erwarten, dass der

pochH-100iV Diff diese Zellen zu den Lymphozyten zählt und eine Warnmeldung anzeigt oder aber kein Differentialblutbild erstellt, um einen Hinweis für eine pathologische Veränderung deutlich zu machen. Drei Patienten wiesen ein Lymphom Grad V auf und der pochH-100iV Diff erstellte immer ein Differentialblutbild, erkannte die lymphatische Blasten allerdings nicht als solche, sondern zählte sie zum Parameter OTHR, der hauptsächlich für die Neutrophilen steht. Lymphoblasten haben einen größeren Kern als Lymphozyten, welcher von der Gerätetechnologie des pochH-100iV Diff erkannt wird. Nach der Reagenzienwirkung sorgt der große Kern für eine größere Impulshöhe (Impedanzmethode) und wird somit der Population von Zellen zugeordnet, die größere Impulshöhen zeigen als Lymphozyten der Population OTHR. Technisch gesehen ist diese Zuordnung somit korrekt, jedoch hat der Anwender keinen Hinweis auf das Vorhandensein von pathologischen Zellen.

In den eigenen Untersuchungen konnte nicht immer eindeutig geklärt werden, warum das Gerät kein Differentialblutbild erstellt hat. Als positiv zu bewerten für den pochH-100iV Diff ist, dass bei Vorliegen deutlicher Veränderungen im Blut, wie bei einer Linksverschiebung mit einer großen Anzahl von stabkernigen Granulozyten oder bei vermehrtem Auftreten von kernhaltigen Erythrozyten bzw. Normoblasten (regenerative Anämie), kein Differentialblutbild erstellt wurde. Zum Teil betraf es aber auch Blutproben mit nur geringgradigen Veränderungen, die Proben wurden zweimal am Gerät analysiert und es lag kein technischer Fehler vor.

Der pochH-100iV Diff unterscheidet sich von anderen Impedanzgeräten dadurch, dass die eosinophilen Granulozyten separat ausgewiesen werden. Insofern ist die schlechte Korrelation bei den eosinophilen Granulozyten von 0,22 (siehe Abb.18) auffällig. Zur weiteren Abklärung, ob der pochH-100iV Diff in der Lage ist eine Eosinophilie richtig zu erkennen, wurde eine ROC-Kurve (ROC = receiver operating characteristic) erstellt und die area under the curve (AUC) berechnet. In der Abbildung 38 ist das Ergebnis der ROC-Kurvenanalyse dargestellt.

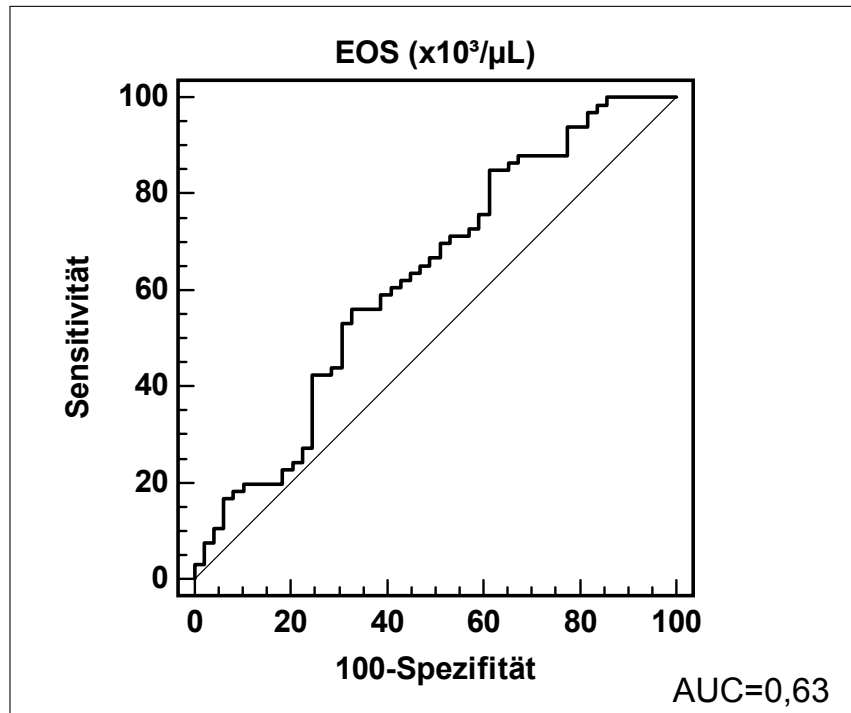


Abbildung 37: ROC-Kurve für die Richtigkeit der Eosinophilieerkennung des pocH-100iV Diff bei Hundeblutproben, angegeben sind die ROC-Kurve (durchgezogene Linie), sowie die Diagonale (gestrichelte Linie).

Der Flächenwert unter der ROC-Kurve in Abbildung 37 beträgt 0,63. Dieser Wert liegt damit an der unteren Grenze (Werte 0,5 bis 1) und bedeutet für den pocH-100iV Diff, dass nur eine geringe Trennschärfe zur Erkennung einer Eosinophilie vorliegt. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für das Differenzialblutbild des pocH-100iV Diff im Vergleich mit der manuellen Methode nur ein ausreichendes Ergebnis erzielt werden konnte und eine mikroskopische Untersuchung des Blutausriches unerlässlich bleibt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse des XT-2000iV aus dem Methodenvergleich mit dem manuell erstellten Differentialblutbild besprochen.

Bevor diese Ergebnisse mit den Literaturangaben verglichen werden, muss auf die statistische Auswertung der eigenen Untersuchungen am XT-2000iV eingegangen werden. Zunächst sind in die Auswertung 284 Differentialblutbilder einbezogen worden. Das Ergebnis der Korrelationen im Vergleich mit der manuellen Methode war mit Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,17$  (Lymphozyten),  $r = 0,26$  (Neutrophile G.),  $r = 0,40$  (Monozyten) und  $r = 0,73$  (Eosinophile G.) als ungenügend zu bewerten.



Die Ergebnisse des Methodenvergleichs dieser ersten Korrelationsanalyse sollen für die Lymphozyten und die neutrophilen Granulozyten graphisch dargestellt werden.

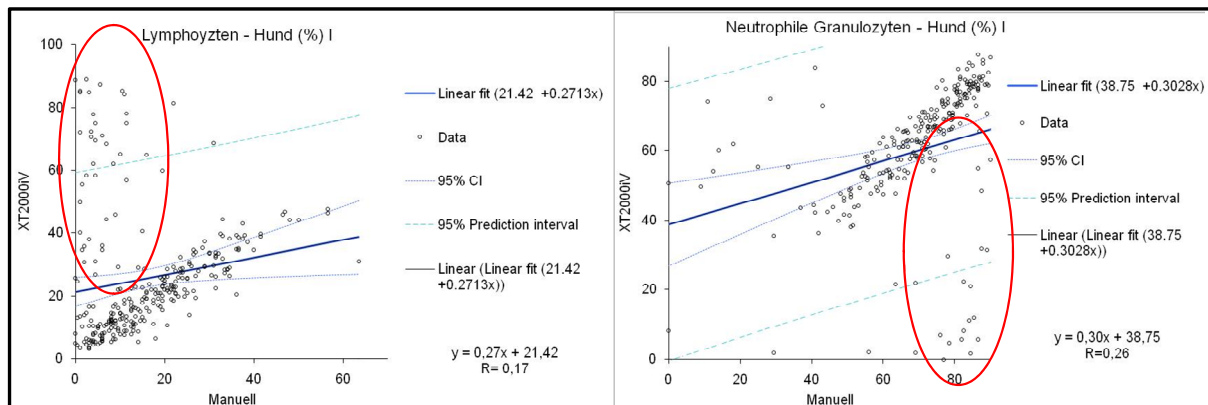


Abbildung 38: Graphische Darstellung der 1. Korrelationsanalyse des Methodenvergleich für die Parameter der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten des XT-2000iV bei der Tierart Hund, n = 284.

In der Abbildung 38 fällt eine große Zahl von Ausreißern (siehe rote Markierung) sowohl bei den Lymphozyten (links) als auch bei den neutrophilen Granulozyten (rechts) auf. Mit Hilfe der Korrelationsanalyse wurden die einzelnen Ausreißer (Patienten) herausgesucht und mit dem manuell erstellten Differenzialblutbild verglichen. Es viel auf, dass es sich bei den Veränderungen der Lymphozyten und Neutrophilen, wie bei Betrachtung der Graphiken schon zu erahnen, um dieselben Patienten handelt und der XT-2000iV diese Blutproben mit unterschiedlichen „Flags“ markierte. Flags sind Warnmeldungen, sogenannte Verdachts- oder Abnormalmeldungen, die eine Probe POSITIV markieren (siehe Kapitel 3.3.5.2). Das Gerät markiert jede zu analysierende Probe, sind keine Veränderungen im Blut vorhanden gilt die Probe als NEGATIV und der Befund kann übernommen werden. Die Flaganalyse der aufgefallenen Ausreißer ergab, dass die meisten Ausreißerproben mit folgenden Flags markiert sind: positiv für morph, count, positiv für diff, count und positiv für diff, morph, count. Diese Flags geben dem Anwender den Hinweis, dass Abweichungen in der Zelldifferenzierung und -zählung und morphologisch abnormale Zellen festgestellt worden sind. Das ausgegebene Differenzialblutbild sollte angezweifelt werden und macht wahrscheinlich eine mikroskopische Untersuchung des Blutausriches notwendig. Betroffen sind Blutproben mit deutlichen hämatologischen Veränderungen, die zu Fehlmessungen bei der automatischen Zählung führen können.

Im Folgenden sollen die Probenanalysen dargestellt werden, die aufgrund von Fehlinterpretationen des XT-2000iV aus der Statistik ausgeschlossen wurden. Insgesamt konnten 51 Ausreißer mit deutlichen Unterschieden zum manuellen Differenzialblutbild erkannt werden. Als Beispiel ist an dieser Stelle eine Linksverschiebung zu nennen, bei der es zu einem starken Anstieg von stabkernigen (unreifen) neutrophilen Granulozyten im Blut kommt. Der XT-2000iV ordnet diese Zellen den Lymphozyten zu, während sie bei der manuellen Differenzierung als stabkernige neutrophile Granulozyten erkannt werden. In den eigenen Untersuchungen waren unreife Neutrophile die häufigste Ursache für eine falschhohe Lymphozytenzahl. Diese Tatsache soll anhand eines Fallbeispielen (Abb. 40) verdeutlicht werden. Zum Vergleich wird das Leukogramm eines gesunden Hundes präsentiert (Abb. 39).

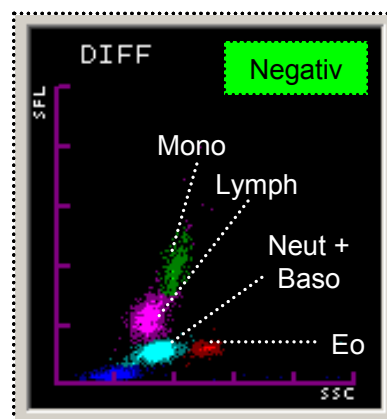
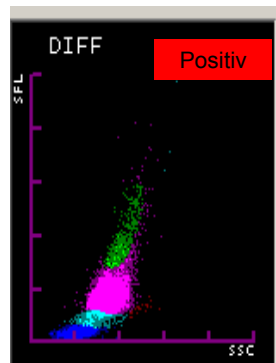


Abbildung 39: Leukogramm eines gesunden Hundes als Vergleich zu den Fallbeispielen



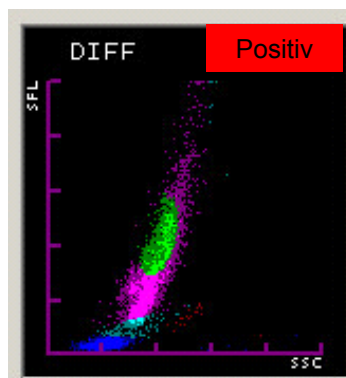
Item	Data	Unit
WBC	19.04 +	$10^3/\mu\text{L}$
NEUT#	0.85	$10^3/\mu\text{L}$
LYMPH#	16.94 +	$10^3/\mu\text{L}$
MONO#	0.93	$10^3/\mu\text{L}$
EO#	0.03	$10^3/\mu\text{L}$
BASO#	0.29 +	$10^3/\mu\text{L}$
NEUT%	4.4	%
LYMPH%	89.0 +	%
MONO%	4.9	%
EO%	0.2	%
BASO%	1.5 +	%

#### Manuelles Diff:

Stabkernige: 29,5%  
 Segmentkernige: 65%  
 Lymphozyten: 2,5%  
 Monozyten: 2,5%  
 Eosinophile: 0,5%

Abbildung 40: Fallbeispiel: Leukogramm und Datenreport (WBC Differential), XT-2000iV, eines Hundes (Shila) mit Linksverschiebung, Diagnose: Sepsis

Eine weitere Ursache der Fehlinterpretation ist das Vorkommen von Patienten mit hämatopoetischen Tumoren der lymphozytären Reihe. Die entarteten Zellen können unterschiedliche Gestalt annehmen, so dass eine Trennung von Lymphozyten und Lymphoblasten häufig schwierig ist. Der XT-2000iV hat bei dem folgenden Beispiel die Lymphoblasten den Monozyten zugeordnet.



Item	Data	Unit
WBC	7.32	$10^3/\mu\text{L}$
NEUT#	0.15	$10^3/\mu\text{L}$
LYMPH#	4.76	$10^3/\mu\text{L}$
MONO#	2.37 +	$10^3/\mu\text{L}$
EO#	0.03	$10^3/\mu\text{L}$
BASO#	0.01	$10^3/\mu\text{L}$
NEUT%	2.1 -	%
LYMPH%	65.0	%
MONO%	32.4 +	%
EO%	0.4	%
BASO%	0.1	%

#### Manuelles Diff.:

Lymphozyten: 16%  
 Monozyten: 1%  
 Stabkernige: 13%  
 Segmentkernige: 43%  
 Blasten: **27%**

Abbildung 41: Fallbeispiel: Leukogramm und Datenreport (WBC Differential), XT-2000iV, eines Hundes (Sidney) mit Lymphoblasten, Diagnose: Lymphom Grad V

Ein ähnliches Problem stellen die aktivierten Lymphozyten bei der Zelldifferenzierung für den XT-2000iV dar. In der Abbildung 42 ist ein Fallbeispiel gezeigt in dem auch die aktivierten Lymphozyten als Monozyten deklariert werden.

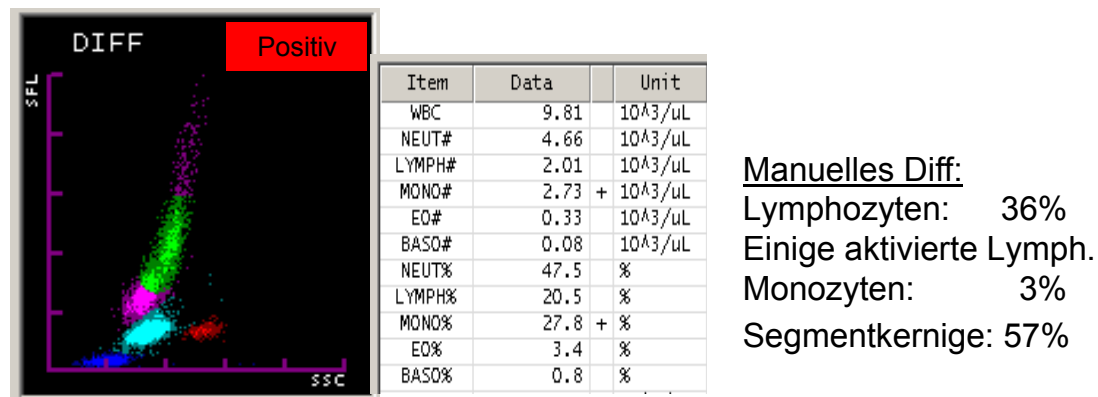


Abbildung 42: Fallbeispiel: Leukogramm und Datenreport (WBC Differential), XT-2000iV, eines Hundes (Tinta) mit aktivierten Lymphozyten, Diagnose: purulente Bronchitis

Vergleicht man die Abbildungen 41 und 42 miteinander wird deutlich, dass die Grenzen der Lymphozyten (pinke Wolke) und Monozyten (grüne Wolke) ineinander übergehen. Das Problem der Monozytenabgrenzung bei automatischen Hämatologiesystemen beschreibt auch FICKENSCHER (2001) bei den Untersuchungen am ADVIA 120. Zur Erinnerung: der ADVIA 120 nutzt zur Abgrenzung der Monozyten von Lymphozyten bzw. neutrophilen Granulozyten den Peroxidasegehalt der Zellen (siehe Kapitel 2.7.4). FICKENSCHER (2001) zeigt an einem Fallbeispiel, dass Neutrophile aufgrund eines Myeloperoxidase-Mangels fälschlicherweise als Monozyten deklariert werden.

Die wichtigste Ursache der Fehlinterpretation von Monozyten liegt wohl in der Vielgestaltigkeit dieser Zellen. Es gibt keine einheitliche Form, selbst die Zellgröße aber auch der Zellinhalt kann stark variieren (JAIN, 1993; WALKER, 1999). Dies kann zum Teil die Schwierigkeiten der Geräte, diese Zellen zu erkennen, erklären.

Beim Vergleich der dargestellten Leukogramme besteht die Schwierigkeit der Zellzuordnung am XT-2000iV wahrscheinlich aufgrund erhöhter Zellaktivität bzw. Fluoreszenzintensität. Die Zellen rutschen dann im Leukogramm weiter nach oben in den Bereich des Monozytenclusters und werden als solche deklariert.

Am Gerät besteht grundsätzlich die Möglichkeit die Grenzen der einzelnen Zellpopulationen manuell zu setzen. Nach manueller Differenzierung wurde dies versucht, jedoch waren aufgrund der Dichte der Zellpopulationen im Leukogramm keine deutlichen Grenzen sichtbar. Dazu muss bemerkt werden, dass die Datenreportansicht am Bildschirm zweidimensional erscheint, das System die einzelnen Zellpopulationen jedoch dreidimensional zuordnet und die manuelle Zuordnung eventuell mit einer 3-D-Ansicht besser möglich wäre.

Weiterhin sind in der angewendeten Softwareversion die spezifisch morphologischen Flags am XT-2000iV unterdrückt, so dass Untersuchungen und Aussagen über diese möglichen Flags bezüglich stabkerniger (unreifer) Granulozyten, Lymphoblasten oder Normoblasten nicht gemacht werden können. In der Studie von LANGFORD et al. (2003) mit dem XT-2000i für Humanblut wurden diese spezifisch morphologischen Flags für Normoblasten und Lymphoblasten untersucht. Manuell wurden hier bei 9 von 114 Patienten Lymphoblasten im peripheren Blut erkannt. Der XT-2000iV kennzeichnete 6 dieser Proben mit entsprechendem Flag. Die 3 nicht erkannten Proben hatten bei manueller Kontrolle eine Blastenanzahl von  $< 1,0\%$ , das Gerät generierte jedoch andere Flags, die ein manuelles Differentialblutbild erforderten. Hinsichtlich dieser separaten Analyse von Normoblasten- und Lymphoblasten-Flags ergab die Studie von LANGFORD für den XT-2000i mit Humanblut eine gute Effizienz (94,7 % für Lymphoblasten, 91,2% für Normoblasten) (LANGFORD et al., 2003).

Sind die Veränderungen in der zu analysierenden Probe so gravierend, dass keine Differenzierung möglich ist, wird im Leukogramm die entsprechende Zellpopulation grau markiert und im Datenreport kein Wert ausgegeben (---). Die folgende Abbildung 43 zeigt ein solches Beispiel von einem Hund mit einer hochgradigen Leukozytose.

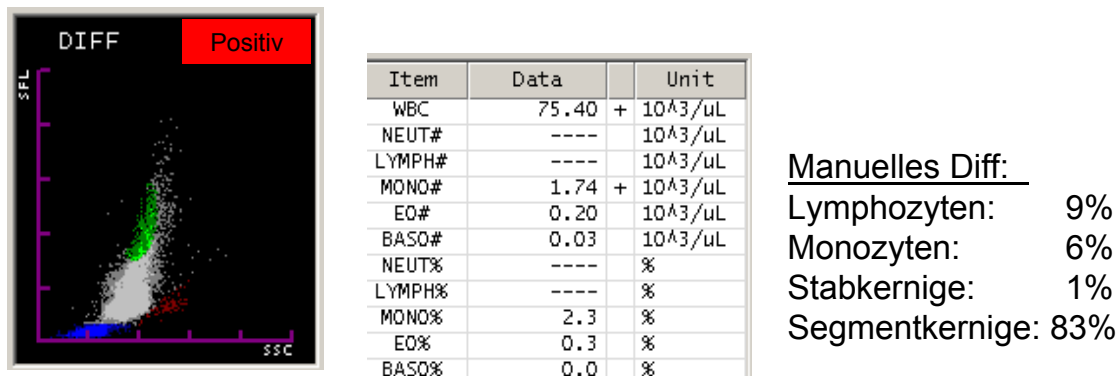


Abbildung 43: Fallbeispiel: Leukogramm und Datenreport (WBC Differential), XT-2000iV, eines Hundes (Kira) mit hochgradiger Leukozytose

Die dargestellten Fälle sind Beispiele für die aufgetretenen Ausreißer bei der ersten Korrelationsanalyse. Nach Ausschluss dieser Fälle aufgrund von Fehlinterpretationen und unvollständigen Differentialblutbildern des XT-2000iV wird die Korrelationsanalyse wiederholt und ergibt wesentlich bessere Ergebnisse (siehe Abb. 44).

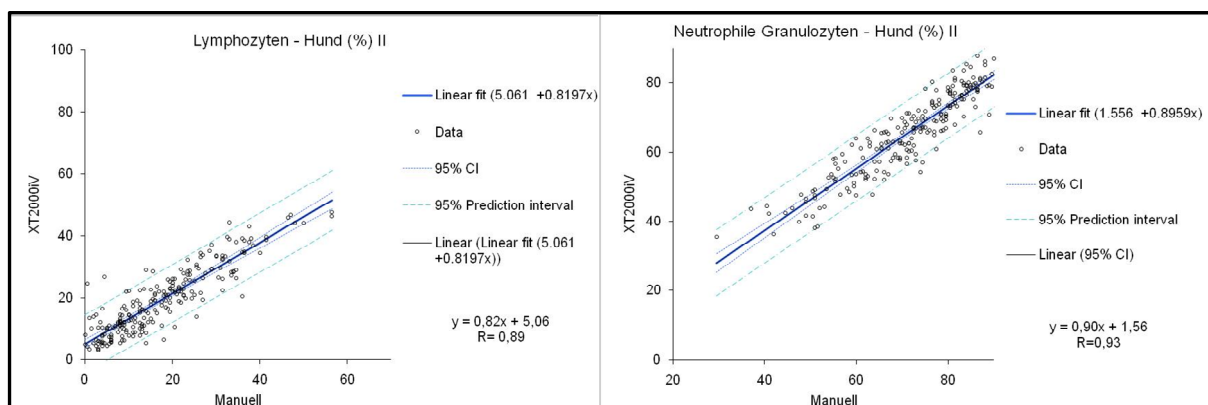


Abbildung 44: Graphische Darstellung der 2. Korrelationsanalyse des Methodenvergleichs für die Parameter Neutrophile G. und Lymphozyten des XT-2000iV nach der Analyse der Ausreißer bei der Tierart Hund,  $n = 235$ .

Nach der Analyse der Ausreißer sollen die Ergebnisse aus dem Methodenvergleich nun den Angaben aus der Literatur gegenübergestellt werden.

Tabelle 28: Vergleich der Korrelationskoeffizienten und Bias für die Parameter des Differentialblutbildes von verschiedenen Hämatologiesystemen aus der Studie FICKENSCHER (2001) und BECKER (2007) für die Tierart Hund mit den eigenen Untersuchungen

Parameter	XT-2000iV vs manuell (eigene U.)	ADVIA120 vs manuell (FICKENSCHER)	Cell-Dyn 3500 vs manuell (BECKER)	ADVIA120 vs manuell (BECKER)
Neutrophile G.	r=0,93 Bias= -6,00	r=0,970 Bias= --	r=0,987 Bias=0,63	r=0,992 Bias= -0,48
Lymphozyten	r=0,89 Bias=1,91	r=0,799 Bias= --	r=0,787 Bias=-0,33	r=0,667 Bias= 0,28
Monozyten	r=0,40 Bias=5,37	r=0,436 Bias= --	r=0,731 Bias= -0,03	r=0,786 Bias= -0,03
Eosinophile G.	r=0,73 Bias=0,15	r=0,785 Bias= --	r=0,792 Bias= -0,22	r=0,816 Bias= 0,10

Die Ergebnisse der Korrelationen im Methodenvergleich aus den eigenen Untersuchungen stimmen mit denen aus der Literatur überein. Ein Grund für die relative große Spanne der Korrelationskoeffizienten bei den Monozyten ist wahrscheinlich wie bereits beschrieben die Vielgestaltigkeit dieser Zellen, aber natürlich kann es auch bei der manuellen Identifizierung der Monozyten zu Fehlinterpretationen kommen. GOOSENS et al. (1991) halten die in der Routinediagnostik angewendete Referenzmethode (100-200 differenzierte Leukozyten panoptisch gefärbt) zusammen mit Interpretationsfehler durch unterschiedliche Untersucher und der ungleichmäßigen Verteilung der Monozyten auf dem Objektträger für ungeeignet. Sie schlagen dafür die Verwendung von monoklonalen Antikörpern vor (RÜMKE, 1960; GOOSENS et al., 1991; FICKENSCHER, 2001).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die erreichten Korrelationskoeffizienten des XT-2000iV für die Parameter der Blutzelldifferenzierung sich im Rahmen der in der Literatur angegebenen Bereiche befinden. Die Ursache für eine anfangs schlechte Korrelation bei den Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten wurde anhand von Fallbeispielen näher erläutert.

### 7.1.2.3 Retikulozytenzählung

Der Methodenvergleich bezüglich der relativen und absoluten Retikulozytenzahl fand zwischen XT-2000iV und der manuellen Zählung von Blutaussstrichen, die mittels Brilliantkresylblau gefärbt wurden, statt. Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,86 (relativ) und 0,85 (absolut) konnte eine akzeptable Korrelation zwischen der manuellen und der automatisierten Messmethodik festgestellt werden (siehe Tab. 10). Das College of American Pathology empfiehlt in seinem Reticulocyte Project für die automatische Retikulozytenzählung mittels Durchflusszytometrie einen Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,95 (SAVAGE et al., 1985).

Bei der Beurteilung der Korrelation muss aber daran gedacht werden, dass hier zwei sehr unterschiedliche Methoden im Vergleich stehen. Die automatische Retikulozytenzählung untersucht über 50 000 Zellen, die manuelle Methode jedoch nur 1000 Zellen. Aufgrund dessen wurden die eigenen Untersuchungen erweitert und beinhalten den Vergleich der automatischen Retikulozytenzählung des XT-2000iV mit denen der Hämatologiesysteme ADVIA120 und ADVIA2120, bei einer Probenzahl von 251 bzw 279. Die Messmethoden dieser Hämatologiesysteme sind vergleichbar und somit erzielt der XT-2000iV Korrelationskoeffizienten von  $\geq 0,98$  (Bias -0,01 – 0,01) im Vergleich mit der automatisierten Zähltechnik (siehe Tab. 29).

Vergleicht man die Resultate der eigenen Untersuchungen mit den Ergebnissen aus der Studie von BECKER (2007), bei der die automatische Retikulozytenzählung verschiedener Hämatologiesysteme im Vergleich stand, zeigt der XT-2000iV bei der Tierart Hund sehr gute Ergebnisse (siehe Tab. 29). LANGFORD et al. erzielten 2003 für den XT-2000i mit Humanblut die Forderung des College of American Pathology mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99 (siehe Tab. 29).



Tabelle 29: Vergleich der Korrelationskoeffizienten und Bias für die automatische Retikulozytenzählung von verschiedenen Hämatologiesystemen aus der Studie BECKER (2007) für die Tierart Hund und aus der Studie LANGFORD et al. (2003) für Humanblut mit den eigenen Untersuchungen.

Geräte	Prinzip *	Korrelationskoeffizient (r) und Bias
		Retikulozyten (absolut)
XT-2000iV vs manueller Zählung	1	r = 0,86 Bias = 0,74
LaserCyte vs ADVIA120	2	r = 0,79 Bias = -36,20
ForCyte vs ADVIA120	3	r = 0,66 Bias = -62,10
XT-2000i vs XE-2100	4 (Human- blut)	r = 0,99 Bias = --
XT-2000iV vs ADVIA2120	1	r = 0,98 Bias = 0,01
ADVIA120 vs XT-2000iV	2	r = 0,98 Bias = 0,01
ADVIA120 vs ADVIA2120	2	r = 0,99 Bias = -0,01

\* *Legende Messprinzipen:*

1 = Fluoreszenz-Durchflussszytometrie und Impedanzmethode, 5-Zell-Diff (inklusive Retikulozyten), 2 = Durchflussszytometrie und Laserstreulichtmesssystem, 5-Zell-Diff (inklusive Retikulozyten), 3 = Laser- und Impedanzmethode, 5-Zell-Diff (inklusive Retikulozyten), 4 = Fluoreszenz-Durchflussszytometrie und Impedanzmethode, 5-Zell-Diff (inklusive Retikulozyten)

### 7.1.3 Linearität und Carry over

Die gemäß dem Protokoll der Richtlinien zur Evaluierung von Blutzellanalysegeräten (ENGLAND et al., 1994) durchgeführten Untersuchungen zur Linearität des poch-100iV Diff und des XT-2000iV lieferten für beide Hämatologiesysteme hervorragende Ergebnisse für die Parameter WBC, RBC und HGB. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 und 12 aufgelistet. Mit den Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,97$  bis  $r = 1$  kann über den Messbereich eine stabile Bestimmung präsentiert werden.

Bezüglich des Carry overs konnten LANGFORD et al., 2003 in den Untersuchungen mit dem XT-2000i bei Humanblut für den Parameter WBC eine minimale Verschleppung von 0,83% und für die Parameter RBC und HGB keine Verschleppung beobachten. FICKENSCHER konnte 2001 in ihren Untersuchungen mit dem ADVIA120 bei Hundeblood für die Parameter WBC, RBC und HB ein Carry over zwischen 0,00% (HB) und 0,17% (RBC) feststellen.

Die eigenen Untersuchungen mit dem XT-2000iV und dem pocH-100iV Diff mit Hundeblood zeigen Carry over Werte für den Parameter WBC, die den geforderten Grenzbereich von  $\leq 0,25\%$  deutlich unterschreiten (pocH-100iV Diff: Verschleppung = 0,00%; XT-2000iV: Verschleppung = 0,03%).

#### **7.1.4 Antikoagulanzenvergleich**

Der Antikoagulanzenvergleich hat ergeben, dass die Gerinnungshemmer zum Teil einen hoch signifikanten Einfluss auf die Messergebnisse der beiden Hämatologiesysteme haben. Der Einfluss betrifft die Thrombozytenzahl und die Erythrozytenindizes (siehe Tab. 16 und 17). Ein Gerinnungshemmer kann ein Schrumpfen oder ein Schwellen der Erythrozyten verursachen. Als Ursache werden in der Literatur inadäquat gefüllte Probenröhrchen diskutiert. Hohe Konzentrationen an EDTA führen zum Schrumpfen von Erythrozyten und damit zu erniedrigten Werten von HKT und MCV (GOOSENS et al., 1991; TVEDTEN, 1981). Ein verlängerter Kontakt der Erythrozyten mit EDTA zum Beispiel während des Proben transports löst wiederum ein Schwellen der Zellen aus (TVEDTEN, 1981). Antikoagulanzen haben ebenfalls einen Einfluss auf die Entstehung von Thrombozytenagglutinen (LOMBARTS und DEKIEVIET, 1988; SAVAGE, 1984; THOMPSON et al., 1983). EDTA führt unmittelbar nach Kontakt zur isovolumetrischen Aufkuglung und somit zur Schwellung der Thrombozyten, auch eine Agglomeration kann ausgelöst werden (MACEY et al., 2002). Citrat hat eher einen stabilisierenden Effekt auf die Thrombozyten (THOMPSON et al., 1983).

In den eigenen Untersuchungen konnte der Einfluss der verschiedenen Gerinnungshemmer auf die Thrombozyten durch den paarweisen Antikoagulanzenvergleich nach der Bonferroni-Methode dargestellt werden. Hier

fallen vor allem am pocH-100iV Diff beim Vergleich Heparin/Citrat hochsignifikante Unterschiede von bis zu 55% auf (siehe Tab.: 16). In der Literatur vermutet FICKENSCHER (2001), dass durch die Verwendung von Li-Heparin als Antikoagulanzen bei Hundeblut es zu einer Abnahme der Plättchenzahl aufgrund der Bildung von Thrombozytenagglutinen kommt. Da der Versuch mit denselben Hundeblutproben auch am XT-2000iV durchgeführt wurde, ist hier mit ähnlichen Ergebnissen zu rechnen. Tatsächlich aber beträgt die prozentuale Abweichung für den Parameter PLT im Vergleich Heparin/Citrat nur 2,71% (siehe Tab.: 17). Eine Erklärung ist die Möglichkeit des XT-2000iV die Thrombozytenzahl auch optisch zu bestimmen. Ist keine genaue Trennung in der Impedanzmessung zwischen Erythrozyten und Thrombozyten zum Beispiel aufgrund von Agglutinen möglich, zeigt die optische Methode mittels Fluoreszenz ein genaueres PLT-Ergebnis. Somit wird die Vermutung von FICKENSCHER (2001), dass auch beim Hund Li-Heparin Thrombozytenagglutinate verursacht, bestätigt.

Als Beispiel wird in den folgenden Abbildungen der Einfluss von  $K_3$ -EDTA und Li-Heparin auf die Thrombozytenzahl anhand des Ergebnisreports des poch-100iV Diff und des XT-2000iV dargestellt.

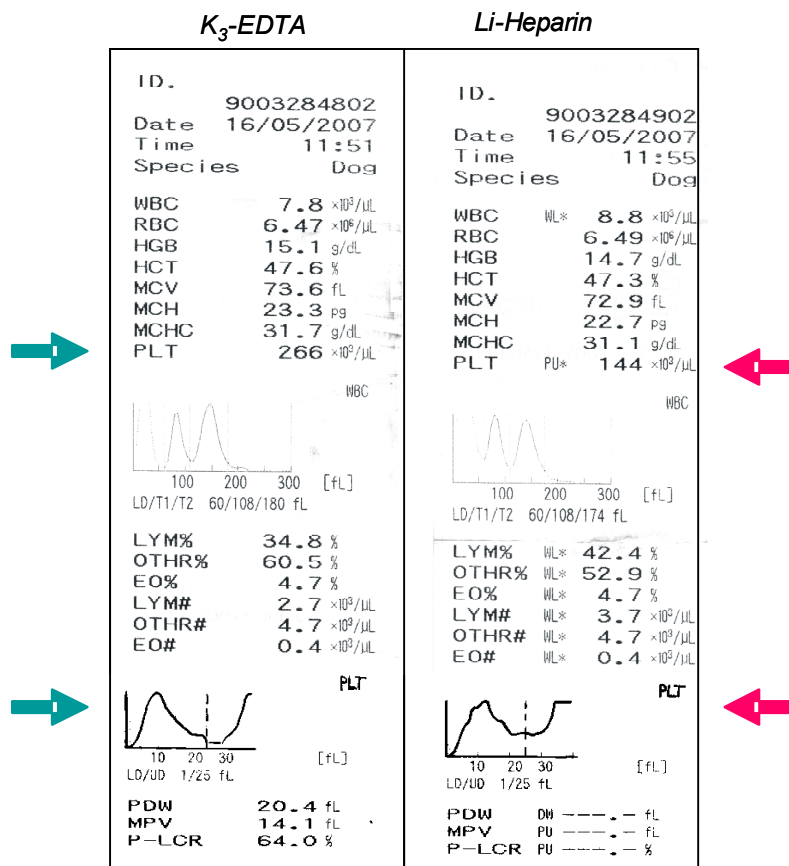


Abbildung 45: Ergebnisreport poch-100iV Diff des Hundes „Shila“ mit verschiedenen Antikoagulanzen (links:  $K_3$ -EDTA, rechts: Li-Heparin)

Im Ergebnisreport des poch-100iV Diff zeigt sich deutlich die Verminderung der Thrombozytenzahl von  $266 \times 10^3/\mu L$  auf  $144 \times 10^3/\mu L$  bei Verwendung des Li-Heparin gegenüber dem  $K_3$ -EDTA als Gerinnungshemmer. Im dazugehörigen Histogramm ist die Aggregation der Thrombozyten anhand einer Verbreiterung der PLT-Kurve graphisch gut zu erkennen. Zusätzlich erfolgt ein Flagging beim Li-Heparin des WBC Wertes (und somit auch Diffs; Flag: WL\*) aufgrund einer Interferenz der Thrombozytenaggregate mit der WBC Zählung.

Im Anschluss wird der Ergebnisreport des XT-2000iV derselben Hundebloodprobe dargestellt.

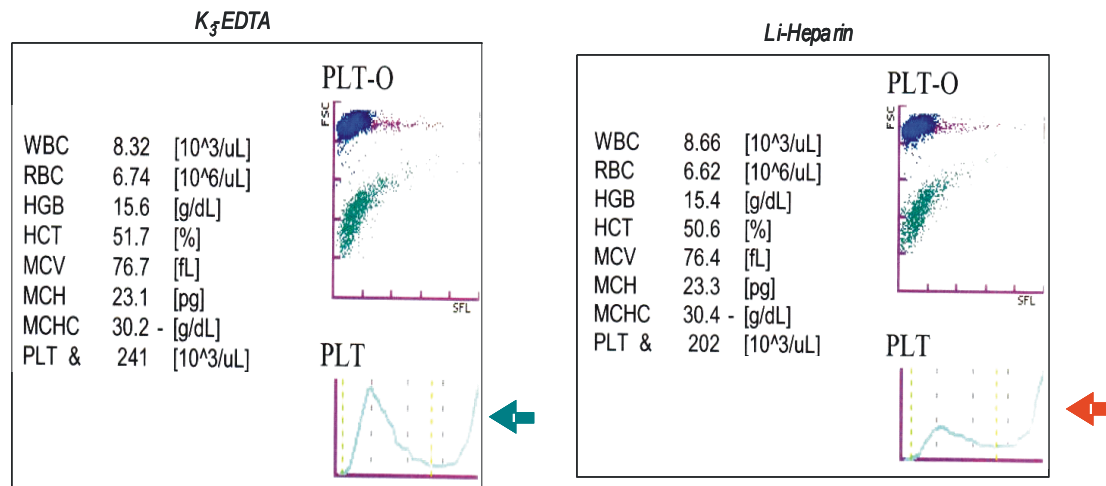


Abbildung: 46: Ergebnisreport XT-2000iV des Hundes „Shila“ mit verschiedenen Antikoagulanzen (links: K<sub>3</sub>- EDTA, rechts: Li-Heparin)

Aus der Abbildung 46 ist ersichtlich, dass der XT-2000iV aufgrund seiner Möglichkeit der optischen Bestimmung der Thrombozyten ein besseres Ergebnis der Thrombozytenzahl bei Verwendung von Li-Heparin liefert. Die ungenaue Trennung in der Impedanzmessung zwischen Erythrozyten und Thrombozyten wird durch die abnorme Verteilungskurve sichtbar (roter Pfeil). Die türkis-farbene Punktwolke zeigt die Thrombozytenzahl nach der optischen Bestimmung mittels Fluoreszenz. Die Verminderung von  $241 \times 10^3/\mu\text{L}$  auf  $202 \times 10^3/\mu\text{L}$  wird als geringgradig bewertet.

Schlussfolgernd aus den Untersuchungen und der Literatur (LOMBARTS und DEKIEVIET, 1988; SAVAGE, 1984; THOMPSON et al., 1983, FICKENSCHER, 2001) ist für die Thrombozytenzählung am pochH-100iV Diff Heparin aufgrund des negativen Einfluss auf die Thrombozytenzahl durch Agglutinatbildung nicht zu empfehlen. Der XT-2000iV liefert aufgrund seiner erweiterten Messtechnologie auch bei Vorkommen von Thrombozytenagglutinaten verlässliche Ergebnisse.

### **7.1.5 Verlaufsuntersuchungen (Blutalterung und Lagerungstemperatur)**

Bezüglich der Beurteilung der Verlaufsuntersuchungen an beiden Hämatologiesystemen sollte berücksichtigt werden, dass es sich bei dem poch-100iV Diff um ein Gerät handelt, welches im alltäglichen Praxisbedarf eingesetzt wird – ein sogenanntes „In Haus Gerät“. Das heißt, die zu analysierenden Blutproben werden in der Regel umgehend oder innerhalb weniger Stunden nach Blutentnahme gemessen. Der XT-2000iV dagegen kann in Kliniken oder Laboratorien eingesetzt werden. Hier spielt die Tatsache, dass immer mehr Tierärzte Einsendelaboratorien nutzen eine größere Rolle. Kenntnisse über lagerungsbedingte Veränderungen der Blutproben sind somit notwendig und in der vorliegenden Arbeit für den XT-2000iV aufgrund der Einsetzbarkeit wahrscheinlich interessanter als für den poch-100iV Diff. Aber auch bei einem „In Haus Gerät“ sollte man wissen, in welchem Zeitrahmen Blutproben gemessen werden müssen, um ein aussagekräftiges Ergebnis erhalten zu können.

Die eigenen Untersuchungen zeigen den Einfluss von Lagerungstemperatur und –dauer auf die Messung von Hundebloodproben durch den XT-2000iV und den poch-100iV Diff. Betrachtet man die Ergebnisse des XT-2000iV (siehe Tab. 20) fällt auf, dass bei der Blutzellzählung die Lagerungsdauer einen hochsignifikanten Einfluss hatte. Bezüglich der Blutzelldifferenzierung betrifft dies die Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und die Retikulozyten. Zusätzlich zeigte sich ein hoch signifikanter Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Messungen der Parameter Hämatokrit und MCV.

Wie aus der Literatur bekannt ist, nehmen Erythrozyten während der Blutalterung Wasser auf und schwellen an (VON RÜCKER et al., 1994). Als Folge beobachtet man einen deutlichen Anstieg des MCV-Wertes und auch des Hämatokritwertes. Bei Ratten- und Mäuseblut wird diese Impräzision bereits nach 16 Stunden beschrieben (KIEFFER, 1995; THOMAS, 1992) gibt als Stabilitätsgrenze für MCV und Hämatokrit bei automatischer Blutanalyse 24 Stunden an (NEUERER, 2005). MORITZ beschreibt, dass bei Zimmertemperatur (22°C) das Volumen caniner Erythrozyten deutlich schneller und stärker ansteigt als bei Aufbewahrung im Kühlschrank (4°C). In seinen Untersuchungen betrug die Veränderung des MCV und auch des Hämatokritwertes nach 72 Stunden ca. 17%, dies ist somit nicht nur hochsignifikant, sondern auch klinisch bedeutsam (MORITZ, 2000). In den vorliegenden

Untersuchungen beider Hämatologiesysteme wird durch das Anschwellen der Erythrozyten ein deutlicher Anstieg des MCV-Wertes bei 22°C ab der 8. Stunde beobachtet. Die Abweichung vom Ausgangswert liegt für beide Geräte nach 72 Stunden bei ca. 30%. Wie in der Literatur beschrieben folgt auch hier durch den Anstieg des MCV- Wertes nach 12 Stunden ein gleichzeitiger MCHC-Abfall und ein Anstieg des Hämatokritwertes (MORITZ, 2000; FICKENSCHER, 2001; NEUERER, 2005). MORITZ erläutert, dass im Gegensatz zu den Hunde-Erythrozyten die bovinen Erythrozyten nur in geringem Maße anschwellen und der Einfluss der Lagerungsdauer über 72 Stunden zwar statistisch signifikant, jedoch klinisch ohne Bedeutung ist (MORITZ, 2000).

Vergleichbar mit den Resultaten von FICKENSCHER (2001) stellt sich der Verlauf der Leukozyten am XT-2000iV dar. Es kann ein steter Abfall bei Raumtemperatur (22°C) beobachtet werden. Am pochH-100iV Diff kommt es zu einem geringgradigen Anstieg der Leukozytenzahl sowohl bei 4°C als auch bei 22°C und die Abweichung vom Ausgangswert beträgt nach 72 Stunden akzeptable 8%.

Die Thrombozytenzahl (siehe Abb. 29) sinkt über die gemessene Zeit an beiden Hämatologiesystemen und weicht nach 24-stündiger Lagerung maximal 30% (pochH-100iV Diff) vom Ausgangswert ab. Am XT-2000iV kann nach 48 Stunden wieder ein Anstieg der Werte zum Ausgangswert beobachtet werden, stärker bei Zimmertemperatur als bei Kühlschranktemperatur. In der Literatur werden diese Beobachtungen mit einer Thrombozytenagglomeration erklärt; allerdings ist dies tierartspezifisch für die Katze und wird in der Literatur nicht für Hundeblut beschrieben (SUCHFORT, 1998). SUCHFORT ermittelt unabhängig von der Aufbewahrungstemperatur eine Abnahme der Plättchenzahl nach 2 Stunden um ca. 50%. Da die Thrombozyten nur bei den ungekühlten Proben nach einiger Zeit wieder ansteigen, vermutet SUCHFORT (1998) eine reversible Thrombozytenagglomeration bei den ungekühlten und eine irreversible Thrombozytenagglomeration bei den gekühlten Proben.

Demgegenüber zeigt bei Raumtemperatur gelagertes Hundeblut signifikante Abweichungen. Zusätzlich zu den bereits erwähnten Parametern zeigen sich auch Unterschiede bei der Differenzierung der neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten am XT-2000iV. MÄDE und WUJANZ beschrieben 1995 bereits, dass es schon nach wenigen Stunden zu deutlichen Veränderungen des Blutes durch die

metabolische Aktivität der Erythrozyten, durch den Zerfall der Leukozyten und den Metabolismus der Plasmaproteine kommt. Diese Veränderungen scheinen größeren Einfluss auf die optischen Eigenschaften der Zellen zu nehmen als auf deren elektrische Leitfähigkeit (NEUERER, 2005). Betrachtet man die Kurvenverläufe der Verlaufsuntersuchung des Differenzialblutbildes des XT-2000iV (siehe Abb. 33 - 36), fällt auf, dass die Zahl der Monozyten und Lymphozyten nach 24 Stunden kontinuierlich abnimmt, und zwar bei Zimmertemperatur stärker als bei Kühlschranks Lagerung. Gleichzeitig steigt die Zahl der neutrophilen Granulozyten. Zur Klärung dieses Phänomens sind in der Abbildung 47 die Leukogramme einer Hundebloodprobe direkt nach der Blutentnahme sowie nach 24, 36 und 48 Stunden gezeigt.

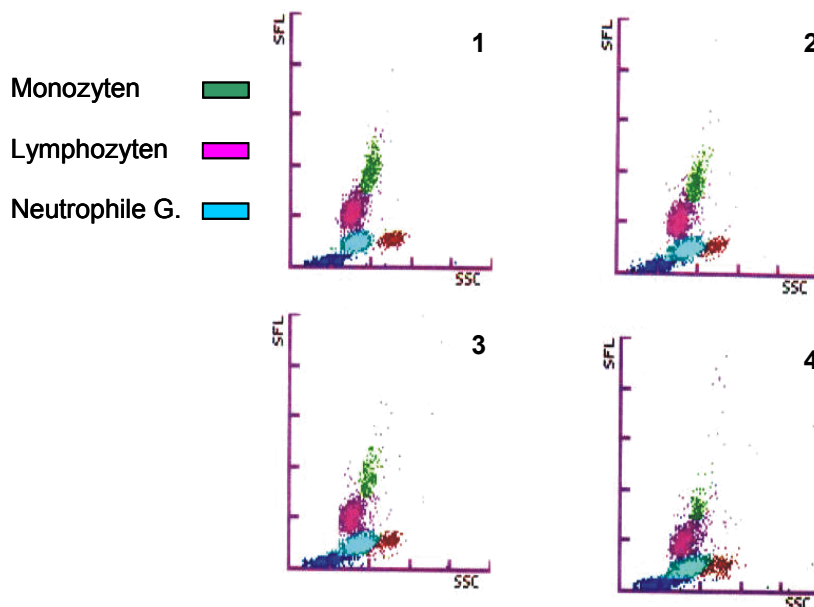


Abbildung 47: Leukogramme Hund: 1 = direkt nach Blutentnahme, 2 = nach 24 h, 3 = nach 36 h, 4 = nach 48 Stunden.

In der Abbildung 47 ist verdeutlicht, dass die Zahl der Zellen im Monozytencluster (grüne Punktwolke) über die Zeit kontinuierlich abnimmt. Dieser Umstand könnte dadurch erklärt werden, dass zum einen die Fluoreszenzintensität abnimmt (y-Achse) und zum anderen die Zellen kleiner werden. Die beschriebenen „Umbauprozesse“, die bereits wenige Stunden nach der Lagerung ablaufen, können ein Grund dafür sein, dass sich die Zellen nach der Perforation der Zellmembranen schlechter mit dem Fluoreszenzfarbstoff anfärben lassen. Eine gleiche Veränderung ist bei den Lymphozyten zu erkennen. Die Zahl der Zellen im Lymphozytencluster (pinke Punktwolke) nimmt ebenfalls kontinuierlich ab und wirkt „aufgelockerter“. Somit



rutschen die Monozyten und Lymphozyten mit der Zeit in das Cluster der Neutrophilen Granulozyten und werden als solche differenziert. Das führt dazu, dass die Neutrophilenzahlen ansteigen. Es ist im Neutrophilencluster (türkise Punktwolke) anhand der Farbdichte und Wolkengröße zu erkennen, dass auch hier sich die Zellen verändern. Die Wolke wird länglicher und zieht auf der x-Achse, welche Informationen über die innere Struktur der Zelle wiedergibt (Granularität), nach rechts,. Beobachtet man den zeitlichen Verlauf weiter fällt auf, dass das gesamte Differenzialblutbild des XT-2000iV betroffen ist, auch die eosinophilen Granulozyten zeigen gerade nach 60 Stunden einen Anstieg von fast 100% vom Ausgangswert. Verdeutlicht wird dies auch hier durch ein Leukogramm (siehe Abb. 48), die Punktwolken verdichten sich immer mehr zu einer Wolke, so daß keine Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen mehr möglich ist.

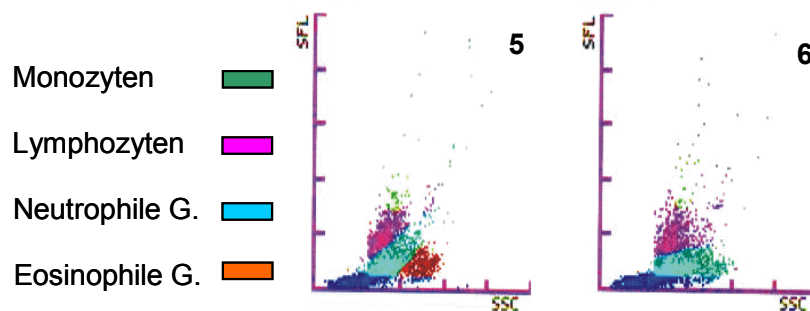


Abbildung 48: Leukogramme Hund: 5 = 60 nach Blutentnahme, 6 = nach 72 Stunden.

In der Literatur beschreibt MORITZ (2000) ein ähnliches Phänomen bei seinen Studien mit dem ADVIA 120. Mit Rinderblut konnte eine kontinuierliche Abnahme der Zellen im Monozytencluster und eine gleichzeitige Lymphozytenzunahme über die Zeit beobachtet werden. Man muß dabei beachten, dass der ADVIA 120 ein anderes Messprinzip als der XT-2000iV zur Differenzierung der Zellpopulationen nutzt (Peroxidaseaktivität siehe Kapitel 2.7.4). Lymphozyten stellen sich dort als kleine peroxidasenegative und Monozyten als größere peroxidasenegative Zellen dar. Die Abnahme der Zellen im Monozytencluster liegt hier an der Abnahme der temperaturabhängigen endogenen Peroxidaseaktivität und an den kleiner werdenden

Zellen. Somit rutschen die Monozyten in das Lymphozytencluster und werden als solche deklariert (MORITZ, 2000).

Der pochH-100iV Diff erstellt im Gegensatz zum XT-2000iV ein 3-Zell-Differenzialblutbild (Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und „OTHR“: hauptsächlich neutrophile G.). In der Verlaufsuntersuchung konnte eine Stabilität der Lymphozytenzahl über 24 Stunden festgestellt werden, im Anschluss steigt die Zahl kontinuierlich an und zwar bei Raumtemperatur stärker als bei Kühlschranklagerung. Die Population „OTHR“ stellt hauptsächlich die Neutrophilen dar, beinhaltet aber auch die Monozyten und eventuell vorhandenen basophile Granulozyten. Ob hier ein ähnliches Phänomen der Zellveränderung und damit Verschiebung der Zellen in andere Zellcluster vorhanden ist, lässt sich anhand der Histogramme des Gerätes nicht nachvollziehen.

Für die automatische Retikulozytenzählung ist in der Literatur bereits nach wenigen Stunden ein Abfall der Retikulozyten beschrieben und es wird eine umgehende Messung empfohlen, sofern die Blutprobe nicht bei 4°C gelagert werden kann (BRUGANARA, 1997; KLINGER, 1997, FICKENSCHER, 2001). In den eigenen Untersuchungen konnte dies nicht bestätigt werden (siehe Abb. 37), der XT-2000iV zeigt nach 6 Stunden einen Anstieg sowohl bei Zimmer- als auch bei Kühlschranktemperatur. 24 Stunden nach Blutentnahme weichen die Werte ca. 10% vom Ausgangswert ab. BUTTARELLO gibt als Ursache für die ungenügende Stabilität der Retikulozytenmessung die fortschreitende Reifung der Retikulozyten während der Lagerung an und erklären somit den Abfall der Zellzahl (BUTTARELLO et al., 2001). MEYER (2005) beschreibt einen Anstieg der Retikulozytenzahl mit Untersuchungen von Katzenblut am ADVIA 120. Es sind ebenfalls ungekühlte und gekühlte Proben betroffen und das Phänomen wird nach mikroskopischer Untersuchung der Blutaussstriche und Auswertung des Ergebnisreportes des ADVIA 120 als Lagerungsartefakt gewertet. Als Ursache für die vom ADVIA 120 ausgewiesenen erhöhten Retikulozytenzahlen werden Koinzidenzen von Ghosts im niedrigen Absorptionsbereich und Koinzidenzen von WBC und PLT diskutiert (MEYER, 2005). Untersuchungen mit Hundeblood am ADVIA 120 zeigten entsprechend den Literaturangaben einen Abfall der Retikulozyten (FICKSCHER, 2001).

Nach dem Messprinzip des XT-2000iV im RET-Kanal werden die Retikulozyten mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Je unreifer eine Retikulozyt ist, desto stärker ist die

Fluoreszenzfärbung. Daraus lässt sich schließen, dass sich mit längerer Lagerungsdauer die Anzahl der Retikulozyten aufgrund ihres Reifungsprozesses vermindern sollte. In den eigenen Untersuchungen handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine reale Retikulozytenerhöhung, sondern um ein Lagerungsartefakt und damit sollte, falls keine umgehende Messung der Probe möglich ist, die Bestimmung innerhalb von 24 Stunden aus der gekühlten Probe erfolgen.

Zusammenfassend kann für die Zellzählung in Übereinstimmung mit SUCHFORT (1998), MORITZ (2000) und FICKENSCHER (2001) festgehalten werden, dass unabhängig von der Lagerungstemperatur die Parameter WBC, RBC und HGB im Hundeblut über 72 Stunden stabil am XT-2000iV und am pocH-100iV Diff gemessen werden können. Für verlässliche Messergebnisse von HCT, MCV und MCHC sollte die Messung innerhalb von 24 Stunden abgeschlossen sein. Für die Thrombozytenzählung wie auch die Retikulozytenzählung ist die umgehende Messung nach Probenentnahme optional. Bei Blutproben, die länger als ca. 24 Stunden bei Raumtemperatur (ca. 36 Stunden bei Kühlschranktemperatur) gelagert werden müssen, ist das automatische Differenzierungsergebnis des XT-2000iV nur noch eingeschränkt verwertbar, das des pocH-100iV Diff nicht mehr anwendbar. Bei Versendung der Blutproben in Laboratorien sollte zum Zeitpunkt der Blutentnahme ein Blutaussstrich angefertigt und beigelegt werden.

## 8 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluierung zweier verschiedener Hämatologiesysteme Sysmex pochH-100iV Diff und XT-2000iV für die Tierart Hund. Ihre Einsetzbarkeit hinsichtlich der hämatologischen Untersuchung beim Hund wird im Vergleich zum ADVIA 2120 in Anlehnung an die veröffentlichten Richtlinien für die Evaluierung von Blutzellanalysegeräten (ENGLAND et al., 1994) und den Richtlinien der ICSH (International Committee for Standardization in Haematology, ICSH, 1994) überprüft.

Der pochH-100iV Diff und der XT-2000iV weisen für die **Präzision innerhalb der Serie** für die Parameter der Blutzählung (WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCHC, MCH) mit Variationskoeffizienten zwischen 0,4% und 1,2% bzw. 0,3% und 1,2% sehr gute Ergebnisse auf. Für die Thrombozytenzählung liegen die Variationskoeffizienten bei 4,9% bzw. 5,4% und sind ebenfalls als sehr gut zu bewerten. Für die Parameter der Blutzelldifferenzierung des pochH-100iV Diff ist die Präzision der eosinophilen Granulozyten (CV = 12,2%) nur mäßig, währenddessen die Präzision der Lymphozyten mit einem Variationskoeffizienten von 2,9% als sehr gut zu bezeichnen ist.

Der XT-2000iV zeigt für sein gesamtes Differenzialblutbild mit CV-Werten von 1,4% bis 4,8% sehr gute Präzisionsergebnisse. Der Variationskoeffizient für die absolute Retikulozytenzählung beträgt 7,8%.

Der **Methodenvergleich** zur Beurteilung der Richtigkeit ergibt für die Parameter WBC, RBC und HCT für den pochH-100iV Diff sehr gute Korrelationen ( $r \geq 0,98$ , Bias = -0,03 bis 0,56). Gute bis mäßige Korrelationen finden sich für die Parameter PLT ( $r = 0,93$ ; Bias = -36,51) und MCV ( $r = 0,89$ ; Bias = -0,55). Für den Parameter MCHC ergibt sich eine sehr schlechte Übereinstimmung ( $r = 0,33$ ; Bias = -0,03). Der pochH-100iV Diff erreicht nur ein ausreichendes Ergebnis hinsichtlich der Blutzelldifferenzierung. Im Vergleich zur Blutzellzählung sind nur 108 Blutproben von ursprünglich 122 Proben in die Statistik eingeflossen, da das Gerät für die verbleibenden Proben kein Differenzialblutbild erstellen konnte. Am auffälligsten ist die fehlende Übereinstimmung der Resultate bei der Eosinophildifferenzierung mit

einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,22$ . Für den Anwender heißt dies, dass eine mikroskopische Untersuchung des Blutausstriches unerlässlich bleibt.

Der XT-2000iV zeigt dagegen für die Parameter WBC, RBC, HCT und PLT sehr gute Korrelationen ( $r \geq 0,98$ , Bias = -56,56 bis 0,22). Gute Korrelationen finden sich für die Parameter HGB ( $r = 0,82$ ; Bias = 1,06) und MCV ( $r = 0,91$ ; Bias = 2,04). Für die Parameter MCH und MCHC ergeben sich mäßige bis schlechte Übereinstimmungen.

Die Literatur zeigt eine Studie von BAUER et al., 2008, in der der ADVIA 120 mit dem ADVIA 2120, hinsichtlich der unterschiedlichen Messmethoden (Zyanmethämoglobinmethode vs. Zyanfreie Hämoglobinmethode) verglichen wird. Die Resultate ergeben einen proportionalen Fehler, der in den eigenen Untersuchungen ebenfalls dargestellt werden kann. Aufgrund dessen werden die Resultate des XT-2000iV und des poch-100iV Diff mit denen des ADVIA 120 verglichen. Daraufhin ergeben sich für den Parameter HGB beider Geräte sehr gute Übereinstimmungen mit dem ADVIA 120 (Korrelationskoeffizienten von 0,94 bzw 0,96).

Für die Retikulozytenzählung ist eine gute Korrelation zwischen der manuellen und der automatisierten Messmethodik festgestellt worden ( $r = 0,87$ , Bias = 0,74). Im Methodenvergleich der Blutzelldifferenzierung sind gute bis sehr gute Korrelationen für Lymphozyten und neutrophile Granulozyten ( $r \geq 0,89$ , Bias: -6,00 – 1,91) erzielt worden. Eine mäßige Übereinstimmung der Methodenergebnisse lässt sich für die eosinophilen Granulozyten und die Monozyten feststellen.

Die **Linearitätsstudie** der beiden Hämatologiesysteme erreicht hohe Korrelationen mit Korrelationkoeffizienten bis 1 für WBC (range  $0-80 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), HGB (range 0-22g/dL) und RBC (range  $0-13 \times 10^6/\mu\text{L}$ ). Somit messen die Hämatologiesysteme poch-100iV Diff und XT-2000iV im Bereich der getesteten Konzentrationen linear.

Das Ergebnis des **Carry overs** für den Parameter WBC des XT-2000iV liegt mit einem Wert von 0,03% deutlich unter dem geforderten Grenzbereich von  $\leq 0,25\%$ . Der poch-100iV Diff weist für den Parameter WBC keine messbare Verschleppung auf.

Bei der Überprüfung des **Einflusses der Antikoagulanzen** (K<sub>3</sub>-EDTA, Li-Heparin und Citrat) auf die Messergebnisse der beiden Hämatologiesysteme können für die Parameter WBC, RBC, HGB, und MCV des pochH-100iV Diff und für die Parameter WBC, RBC, HGB, PLT, und RET des XT-2000iV keine signifikanten Unterschiede der Messwerte festgestellt werden.

Am pochH-100iV Diff kann für die Parameter MCH, MCHC und HCT eine prozentuale Abweichung von bis zu 13,26 % zwischen den verschiedenen Antikoagulanzen festgestellt werden. Die Thrombozytenzahl weicht im Vergleich Li-Heparin/Na-Citrat sogar bis zu 55,54% ab. Auffällig am Differentialblutbild ist eine starke Abweichung der eosinophilen Granulozytenzahl von 57,28% im K<sub>3</sub>-EDTA/Heparin Vergleich. Der XT-2000iV zeigt für die Parameter MCV, MCH, MCHC und HCT eine prozentuale Abweichung von bis zu 10,47% zwischen den verschiedenen Antikoagulanzen. Die Thrombozytenzahl weicht anders als beim pochH-100iV Diff im Vergleich Li-Heparin/Na-Citrat nur um 2,71% ab. Im Differentialblutbild zeigt sich eine prozentuale Abweichung bei den neutrophilen Granulozyten von 12,41% im Li-Heparin/Na-Citrat Vergleich.

Für beide Hämatologiesysteme ist der Gerinnungshemmer K<sub>3</sub>-EDTA zur Analyse von Hundebloodproben am besten geeignet.

Die Untersuchungen des **Einflusses der Lagerungstemperatur (4°C, 22°C) und der Lagerungsdauer (72 Stunden)** ergeben, dass der Einfluss der Temperatur statistisch für beide Hämatologiesysteme nicht signifikant ist, der Einfluss der Zeit jedoch ist hoch signifikant. Die Messergebnisse für den Parameter PLT des pochH-100iV Diff und des XT-2000iV sind bereits nach ungefähr 6 Stunden mit Vorsicht zu interpretieren. Die durchgeführte Verlaufsuntersuchung zeigt weiterhin, dass sowohl die Blutzellzählung als auch die -differenzierung am XT-2000iV und am pochH-100iV Diff nach 24 Stunden abgeschlossen sein sollte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der pochH-100iV Diff als Gerät zur Zellzählung sehr gut für den alltäglichen Praxisbedarf geeignet ist und sehr gute (für einige Parameter befriedigende) Informationen liefert. Jedoch kann auf die mikroskopische Untersuchung des Blutaussstriches nicht verzichtet werden.

Das Hämatologiesystem Sysmex XT-2000iV ermittelt verlässliche Ergebnisse bei Zellzählung und –differenzierung für die Tierart Hund. Besonders bei Proben mit pathologischen Veränderungen ermöglicht die graphische Darstellung in Form von Histo- und Scattergrammen das Erkennen von abnormem Zellaufkommen oder abweichender Zellmorphologie zur sicheren Diagnosestellung.

## 9 SUMMARY

The objective of this study is the evaluation of two different haematology systems Sysmex poch-100iV Diff and XT-2000iV for the species dog. The applicability of these systems for haematological analysis of dogs was checked along the public guidelines for the evaluation of blood cell analyzers (ENGLAND et al., 1994) and the guideline of ICSH (International Committee for Standardization in Haematology, ICSH, 1994).

Poch-100iV Diff and XT-2000iV reflect very good **results within single batches** for the parameters of blood cell count (WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCHC, MCH) with coefficients of variation ranging from 0.4% to 1.2% and 0.3% to 1.2%. The coefficients of variation for the thrombocyte count are 4.9% and 5.4% indicate a very good result as well. While the blood cell differentiation parameters for poch-100iV Diff with regard to the precision of eosinophils (CV = 12.2%) are just moderate, they are very good for lymphocytes with 2.9%.

The XT-2000iV achieves for the entire blood cell differentiation excellent results with CV's of 1.4% to 4.8%. The coefficient of variation for the absolute reticulocyte count is 7.8%.

Very good correlations were achieved for the parameters WBC, RBC and HCT ( $r \geq 0.98$ ; bias = -0.03 to 0.56) for the determination of the accuracy for **comparing the measurement** results for the poch-100iV Diff. For the parameters PLT ( $r = 0.93$ ; bias = -36.51) and MCV ( $r = 0.89$ ; bias = -0.55) correlation was good to moderate while for MCHC results were very poor ( $r = 0.33$ ; bias = -0.03). Overall, the poch100iV Diff can only reach an adequate result for the blood cell differentiation. In comparison to the blood cell count, only 108 blood samples from initial 122 samples have been included in the statistic, since the system could not generate for the remainder a blood cell differentiation. Noticeable is the missing compliance of the results of the eosinophil differentiation with a correlation coefficient of  $r = 0.22$ . This means as a consequence for the users that a microscopic examination of the blood smear is required.

The XT-2000iV reflects in contrast to the above an excellent correlation for the parameters WBC, RBC, HCT and PLT ( $r \geq 0.98$ , bias = -56.56 to 0.22) and good



correlation for HGB ( $r = 0.82$ ; bias = 1.06) and MCV ( $r = 0.91$ ; bias = 2.04). The parameters MCH and MCHC reflect only moderate to poor consistency.

A study from Bauer et al., 2008 reflects the comparison of different measurement methods (Cyanmethaemoglobin- vs. cyanfree-haemoglobinmethod of ADVIA120 and ADVIA 2120. The outcome reflects a proportional error, which can also be found in this evaluations results. This is the reason, why the results of XT-2000iV and poch-100iV are compared with the results of ADVIA 120. As a result, very good correlations can be recorded for the parameter HGB for both systems ( $r = 0.94$  and  $0.96$ ).

A good correlation was found between the manual and the automatic reticulocyte count ( $r = 0.87$ , bias = 0.74). For the comparison of the measurement results of the blood cell differential of this system with the reference analyzer and methods good to excellent correlation for lymphocytes and neutrophils ( $r \geq 0.89$ , bias: -6.00 – 1.91) have been achieved while the results for eosinophils and monocytes were just moderate.

The assessment of the **linearity** of both systems reaches excellent results for the correlation coefficient up to 1 for WBC (range  $0-80 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), HGB (range  $0-22\text{g/dL}$ ) and RBC (range  $0-13 \times 10^6/\mu\text{L}$ ). Consequently, both haematology systems poch-100iV Diff and XT-2000iV are measuring linear within the scope of tested concentrations. The results of the **carry over** for the parameter WBC from the XT-2000iV remains with 0.03% substantially below the required minimum level of  $\leq 0.25\%$ . The poch-100iV Diff does not reflect any carry over in this regard.

A study of **the influence of the anticoagulants (K<sub>3</sub>-EDTA, Li-heparin and citrate)** on the measurement results of the parameters WBC, RBC, HGB and MCV of poch-100iV Diff and of the parameters WBC, RBC, HGB, PLT and RET of XT-2000iV showed no significant measurement differences.

A deviation between the different anticoagulants of up to 13.26% can be recorded for the parameters MCH, MCHC and HCT for poch-100iV Diff. The thrombocyte count can even deviate in comparison to Li-heparin/Na-citrate up to 55.54%. A strong

deviation of the eosinophile granulocytes count of 57.28% is noticeable for the blood cell differentiation within the K<sub>3</sub>-EDTA/heparin comparison. The XT-2000iV reflects for the parameter MCV, MCH, MCHC and HCT a deviation of up to 10.47% between different anticoagulants. The thrombocyte count in comparison to Li-heparin/Na-citrate deviates just 2.71% in contrast to the pocH-100iV Diff. The blood cell differentiation shows a deviation related to the neutrophils of 12.41% in the Li-heparin/Na-citrate comparison.

The anticoagulant K<sub>3</sub>-EDTA is best suited to analyze blood samples of dogs with both haematology systems.

An analysis of the **influence of storage temperature (4°C, 22°C) and duration (72 hours)** reveals that temperature changes do not show significant impact for both haematology systems while the factor time is highly significant. Therefore, the measurement results for the parameter PLT for pocH-100iV Diff and XT-2000iV should be evaluated cautiously after 6 hours. The blood cell differentiation as well as blood cell counts should in any case be completed after 24 hours for both systems.

In conclusion, the pocH-100iV Diff is a very good hematology system if used for blood cell counts for the daily use in small private clinics as it achieves very good (for some parameters satisfactory) results. However, a microscopic examination of the blood smear is required.

The Sysmex XT-2000iV achieves reliable results for blood cell counts and differentiation for the species dog. Features like the graphical histograms and scattergrams enable the user to detect especially samples with pathological changes such as abnormal cell appearances or alternative cell morphology more easily in order to achieve a profound diagnosis.

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

BAUER, N., MORITZ, A. (2008)

Evaluation of the cyanid-free method for hemoglobin measurement with the ADVIA2120 in Dogs, Cats and Horses

BAYER HEALTHCARE (2003):

Spezifikationen ADVIA2120

Hämatologie System

BAYER HEALTHCARE (2003):

ADVIA120

Hämatologiesystem

Informationen für Gerätedemonstrationen

BECKER, B. (2007):

A Comparative Study Of Seven In-House And Two Laboratory Hematology Instruments

Dissertation

BLAND JM, ALTMAN DG (1986):

Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, 307-317.

BRUGNARA, C.; HIPPE, M.J.; IRVING, P.J.; LATHROP, H.; LEE, P.A.; MINCHELLO, E.; WINKELMAN, L. (1994):

Automated Reticulocyte Counting and Measurement of Reticulocyte Cellular Indices. Am. J. Clin. Path., 102, 623-632

BUTARELLO, C.; RIVERA, A.; MINCHELLO, E.; DEANE, V. (1997):

ADVIA120 Hematology System: Reticulocyte and Workflow Analysis.

In: Proceedings of the First International Bayer Diagnostics Central Laboratory Symposium, 23-25

DIN 58931 (1995):

Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut, Referenzmethode.

Deutsches Institut für Normung e.V., 1-4.

DÖRNER, K.; SCHULZE, S.; REINHARDT, M.A. (1993):

Erste Evaluationsergebnisse mit dem Hämatologiesystem Cell-Dyn 3500.

Klin.Lab., 39-44.

D'ONOFRIO, G.; ZINI, G.; VERGINE, C.; DARRIN, G.; CHIRILLO, R. (1997):

New Parameters for Diagnosis and Management of Anemia.

In: Proceedings of the First International Bayer Diagnostic Central Laboratory Symposium, 14-16.

DURA, A. (2005):

Blutzellzählung und –Differenzierung bei Pferd und Schwein mit dem Hämatologiesystem ADVIA120 Gerätevalidierung und Softwareadaptation  
Dissertation

ENGLAND, J.M.; ROWAN, R.M.; VAN ASSENDELFT, O.W.; BULL, B.S.; COULTER, W.H.; FUJIMOTO, K.; GRONER, W.; JONES, A.R.; KOEPKE, J.A.; LEWIS, S.M.; SHINTON, N.K.; TATSUMI, N.; THOM, R.; VERWILGHEN, R.L.; MCLAREN, C.E. (1994):

Guidelines for the Evaluation of Blood Cell Analysers Including Those Used for Differential Leucocyte and Reticulocyte Counting and Cell Marker Applications. Clin.Lab.Haematol., 157-174.

FICKENSCHER, Y. (2001):

Softwareadaptation und Evaluation des lasergestützten Multiparameter-Hämatologiesystems ADVIA120 bei der Tierart Hund

GOOSSENS, W.; VAN, D.; VERWILGHEN, R.L. (1991a):

K2- or K3-EDTA: the anticoagulants of choice in routine haematology. Clin.Lab.Haematol., 13, 291-295.

GOOSSENS, W.; VAN-HOVE, L.; VERWILGHEN, R.L. (1991b):

Monocyte counting: Discrepancies in results obtained with different automated instruments. J.Clin.Path., 44, 224-227.

HANLEY, J.A., Mc Neil B.J. (1982):

The meaning and use of the area under the Receiver operating Characteristic (ROC) curve. Radiology 143, (29-36)

HOLSTEG, M. (2002)

Softwareadaptation und begleitende Evaluation des Hämatologiesystems ADVIA120 für die Tierart Rind; Erstellung von hämatologischen Referenzbereichen für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und deutsches Fleckvieh.  
Dissertation

ICSH (1978):

Guidelines for the Evaluation of Blood Cell Analysers Including Those Used for Differential Leucocyte and Reticulocyte Counting and Cell Marker Applications. Clin.Lab.Haematol., 16, 157-174.

ICSH (1985):

Recommended methods for cytological procedures in haematology. Clin.Lab.Haematol., 7, 55-74.

JAIN, N.C. (1993):

Essentials of Veterinary Hematology.  
Lea.& Febiger, Philadelphia.

LANGFORD, K., LUCHTMAN-JONES, MILLER, R., WALCK, D. (2003):  
Performance Evaluation of the Sysmex XT-2000i Automated Hematology Analyzer  
Carden Jennings Publishing Co., Ltd  
Laboratory Hematology 9:29-37

LOMBARTS, A.J.P.F.; DEKIEVIET, W.A. (1988):  
Automatische Zellzählung und Zelldifferenzierung mit dem Technicon H\*1 bei  
Blutproben der Katze.  
Kleintierpraxis, 42 703-708

KIEFER, G.G. (1995):  
CELL-DYN 3500 – A fully automated instrument for veterinary hematology:  
Performance evaluation for analysis of mouse and rat blood.  
Dissertation

MERCK (1990a):  
Faerbeanleitung für MERCK-Leucognost POX-Färbung.

MERCK (1990b):  
Färbearbeitung für MERCK-Leucognost EST-Färbung.

MEYER, K. (2005):  
Softwareadaptation und Evaluation des ADVIA120 bei der Tierart Katze  
Dissertation

MOHR, E. (1995):  
Sysmex E 2500  
Dissertation

MORITZ, A. (2000):  
Der Einsatz lasergestützter Multiparameter- Hämatologiesysteme in der  
Veterinärmedizin.  
Büchse der Pandora; Verlagsausgabe; ISBN 3-88178-169-2.

NEUERER, F.N. (2005)  
Evaluation des vollautomatischen Hämatologiegerätes CELL-DYN 3500 im  
klinischen Einsatz bei Hund und Katze  
Dissertation

PAMKRAZ, A. (2007)  
Detection of canine immature platelets by flow cytometry and with an  
automatedhematology analyzer

ROLEFF, S. (2004):  
Klinische Evaluierung des automatischen Blutzellzählgerätes CA530-VET durch  
Vergleich mit dem CELL-DYN 3500 und Standardmethoden für die Tierarten Hund,  
Katze und Pferd  
Dissertation

RÜMKE, C.L. (1960):  
Die Zelldifferenzierung in Blutaussstrichen: Variabilität der Ergebnisse.  
Triangle., 4, 154-158.

SAVAGE, R.A.; SKOOG, D.P.; RABINOVITCH, A. (1985):  
Analytic inaccuracy and imprecision in reticulocyte counting: a preliminary report  
from the College of American Pathologists Reticulocyte Project.  
Blood Cells., 11, 97-112.

SYSMEX (2006):  
Automated Hematology Analyzer poch-100iV Diff  
Instructions for Use

SYSMEX (2006):  
poch-100iV Diff Histogramme und Flagging  
PM Veterinary Applications SEG

SYSMEX (2008):  
poch-100iV Diff Specifications  
Product Training

SYSMEX (2000):  
Schulungsunterlagen XT-2000i

WEBER, C. (1992):  
Prüfung eines für die Humanmedizin entwickelten Hämatologie-Analysesystems auf  
Anwendbarkeit in der Veterinärmedizin.  
Prak.Tierarzt., 11, 1037-1040.

SUCHFORT, C. (1998):  
Die automatisierte Blutzellzählung und-differenzierung mit dem Technicon H\*1 bei  
der Katze unter besonderer Berücksichtigung der Thrombozyten und der  
Erythrozytenmorphologie bei Anämien.  
Vetmed Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

THOMAS, L.; MÜLLER TH.; RODRIAN J. (1989):  
Vergleich der Bestimmung von Leukozytenpopulationen am Technicon H\*1 mit der  
mikroskopischen Differenzierung.  
Lab.Med., 13, 213-219.

TVEDTEN, H.W. (1981):  
Hematology of the normal dog and cat.  
Vet.Clin.North.Am.Small.Anim.Pract., 11, 209-217.

VON RÜCKER, A.; HENKEL, E.; HAECKEL, R.; DIEM, H.; GUNZER, H.;  
MÜLLER, H.A.G.; NEBE, T.; WEBER, R.; JÖNSSON, D.; HELLER, S.;  
BRÜGGEMANN, M.; FINK, P.; KALOUS, J.; KATZ, N.; KUTZNER, M.; LENZ, T.;  
LIPS, H.; MÜLLER, W.; PICK, K.H.; PINTO, G.; PROHASKA, W.; RAFFAEL, A.;

REINECKE,T.; ROTHE,G.; RUBY,C.; SACHSE,C.; SEEGER,H.T.; SCHMITZ,G.; SCHNEIDER,W.; STOBRAWA,F.; VAN WERSCH,J.W.J.; ZIERVOGEL,H. (1994): Evaluationsprotokoll für hämatologische Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräte. Klinische Chemie Mitteilungen, 25, 272-286.

WEBER,R. (1992):  
Meßprinzipien in der Hämatologie.  
MTA Extra, 16, 4-24.

WEISER,M.G. (1982):  
Erythrocyte Volume Distribution Analysis in Healthy Dogs, Cats, Horses and Dairy Cows.  
Am.J.Vet.Res., 163-166.

WEISER,M.G. (1983):  
Comparison of Two Automated Multi-Channel Blood Cell Counting Systems for Analysis of Blood of Common Domestic Animals.  
Vet.Clin.Path., 25-32.

WEISER,M.G. (1995):  
Erythrocyte responses and disorders.  
In: Ettinger, S. J. and Feldmann: Textbook of veterinary internal medicine, 1864-1891.

WEISER,M.G.; KOCIBA,G.J. (1983):  
Sequential Changes in Erythrocyte Volume Distribution and Microcytosis Associated with Iron Deficiency in Kittens.  
Vet.Path., 20, 1-12.

ZIEGLER, A. (1997)  
Die automatische Blutzelldifferenzierung mit den Hämatologiesystemen Microx 70 und Technicon H\*1 beim Hund  
Dissertation

**Die beigegefügte CD enthält alle Graphiken der Regression- und Bland-Altman-Analyse.**

## 11 DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Moritz für die Überlassung des Themas. Seine Beratung und fachliche Hilfestellung bei allen Problemen hat entscheidend zur Entstehung der Arbeit beigetragen.

Der Firma Sysmex Europe GmbH aus Norderstedt, für die Anregung der Studie. Insbesondere Dr. Melanie Ginder und Manfred Wöhlert, für die fundierte fachliche und technische Unterstützung.

Weiteren herzlichen Dank möchte ich dem gesamten Laborteam der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin in Gießen aussprechen, für die Hilfe und Unterstützung der umfangreichen Laborarbeiten.

In gleicher Weise gilt mein Dank auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Kleintiere. Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Julia Nakagawa für ihre kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

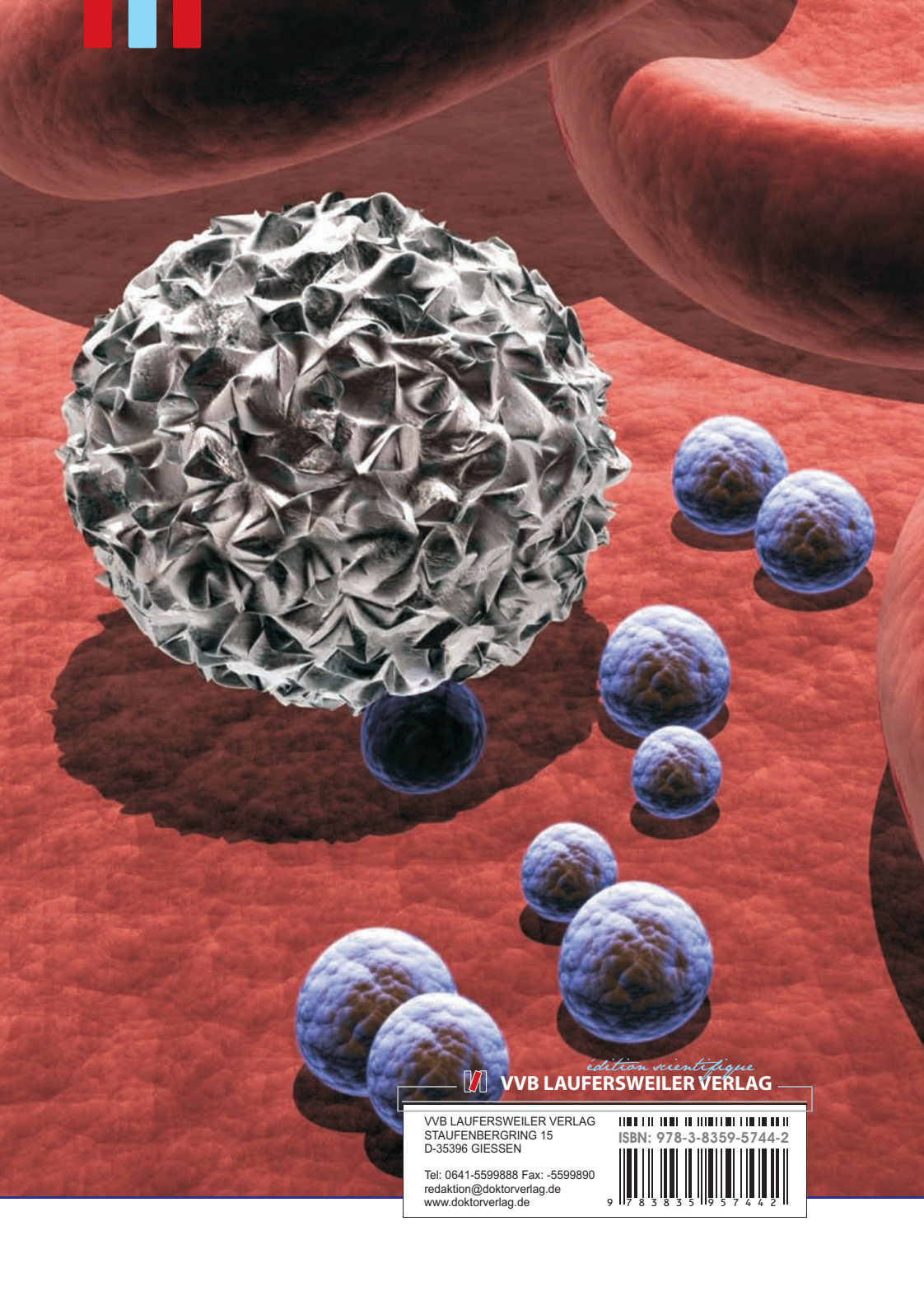
Ein ganz besonderer Dank geht an einen Freund, Marc Uerlings, für die vielen wertvollen Hilfestellungen bei den regelmäßig auftretenden Computerproblemen.

Erklärung



Ich erkläre: >> Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.<<

Cathrin Dunker, 2010



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5744-2



9 783835 195744 2